

Aus dem Institut für Parasitologie und Parasitäre Krankheiten
der Tiere

der Justus Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. G. Lämmle

**Zur Frage des Sauerstoffverbrauches der Oocysten
von Eimeria stiedai (LINDEMANN, 1865)
KISSKALT & HARTMANN, 1907 (Sporozoa, Coccidia)
während und nach der Sporulation**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Aderemi Olufemi Ayeni
Tierarzt aus Ikole-Ekiti, Nigeria

Gießen 1969

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Parasitologie und Parasitäre Krankheiten
der Tiere
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. G. Lämmler

Zur Frage des Sauerstoffverbrauches der Oocysten
von Eimeria stiedai (LINDEMANN, 1865)
KISSKALT & HARTMANN, 1907 (Sporozoa, Coccidia)
während und nach der Sporulation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Aderemi Olufemi Ayeni
Tierarzt aus Ikole-Ekiti, Nigeria

Gießen 1969

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
in Giessen

Dekan: Prof. Dr. H. Tillmann

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Lämmler

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Februar 1970



Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Schrifttum	1
III. Material und Methode	8
A. Gewinnung des Untersuchungsmaterials	8
1. Gewinnung und Reinigung der Oocysten	8
2. Standardisierung der Oocystensuspensionen	11
B. Manometrische Untersuchungen	11
1. Versuchsbedingungen	11
2. Versuchsanordnung	12
3. Berechnungs- und Auswertungskriterien	13
IV. Ergebnisse	16
A. Ergebnisse der methodischen Voruntersuchungen	16
1. Die Wirksamkeit von Kalilauge zur Reinigung von <u>E. stiedai</u> -Oocysten und ihr Einfluß auf die Sporulation	16
2. Der Einfluß verschiedener Aufbewahrungsmedien auf die Sporulation der <u>E. stiedai</u> -Oocysten und auf den Keimgehalt der Oocystensuspensionen	18
3. Ergebnisse der Fehlerbestimmungen	20
B. Ergebnisse der manometrischen Versuche	20
1. Vorversuche zur Ermittlung des Sporulationsverlaufes	20
2. Ergebnisse der manometrischen Hauptversuche	25
3. Beziehung zwischen dem Sporulationsverlauf und dem Sauerstoffverbrauch der <u>E. stiedai</u> -Oocysten	27
4. Ergebnisse der statistischen Auswertung der beiden manometrischen Hauptversuche (I, II)	27
5. Ergebnisse der Untersuchungen des Sauerstoffverbrauches der Oocysten von <u>E. stiedai</u> im Anschluß an ihre Sporulation	44
V. Diskussion	48
VI. Zusammenfassung, Summary	55
VII. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	59
VIII. Literaturverzeichnis	62

I. Einleitung

Bei der Bekämpfung der wirtschaftlich wichtigen Coccidienerkrankungen der Haustiere spielt nicht nur die medikamentelle Therapie, sondern, auf Grund der Entwicklung des Parasiten, auch die Vernichtung der ektogenen Stadien durch die Desinfektion eine Rolle. Die entscheidende Voraussetzung für erfolgreiche Bekämpfungsmaßnahmen ist jedoch eine genaue Kenntnis der Biologie des Parasiten, insbesondere seiner endogenen und ektogenen Entwicklungsphase.

Die endogene Entwicklung der für die Haustiere pathogenen Coccidien ist meist gut bekannt und in ihren morphologischen Einzelheiten weitgehend erforscht. Trotz umfangreicher Untersuchungen bestehen jedoch in unserem Wissen noch viele Lücken über die während der endogenen und ektogenen Entwicklungsphase ablaufenden biochemischen Vorgänge und ihre physikalischen Voraussetzungen.

Einen Beitrag zur Klärung einiger dieser die Phase der ektogenen Sporulation betreffenden Fragen soll die vorliegende Arbeit leisten.

Die entscheidende Voraussetzung für experimentelle Arbeiten mit Coccidien ist die Gewinnung und Aufbewahrung der reinen, reifen und sporulationsfähigen Oocysten. Man kann sie entweder direkt aus dem Gewebe isolieren, in welchem sie sich entwickeln oder sie aus den Ausscheidungsprodukten ihrer Wirte durch Anreicherung gewinnen. Häufig ist man dabei gezwungen, sie einem Reinigungsprozess, oft unter Verwendung stark wirkender Chemikalien, zu unterwerfen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Atmungsaktivität der Oocysten im Verlauf und nach der Sporulation bei einigen auf diese Weise isolierten Oocystensuspensionen von Eimeria stiedai untersucht und mit den in der Literatur vorliegenden Ergebnissen bei der gleichen und anderen Eimeria-Arten verglichen.

II. Schrifttum

Über die Gewinnung der Oocysten von Coccidien liegen im Schrifttum eine Reihe von Publikationen vor. Zur Orientierung über Verfahren, mit deren Hilfe man reinste Oocystenkulturen für analytische

Zwecke gewinnen kann, sind jedoch nur wenige Arbeiten von Interesse. SHARMA, FOSTER und REID (1962/63) verwendeten als erste die von RIBI und HOYER (1960) für die Gewinnung und Reinigung von Q-Fieber-Rickettsien entwickelte Dichte-Gradienten-Zentrifugation zum Sammeln reiner Coccidienoocysten. Die Methode wurde später von STEINHAGEN (1968) durch die Vorschaltung einer Kochsalzflotation verbessert. WAGENBACH, CHALLEY und BURNS (1966) erhielten detritus- und keimfreie Oocystensuspensionen durch die Behandlung von Gewebshomogenaten infizierter Tiere, zunächst mit 5,25 %iger Natriumhypochloritlösung und anschließend mit einer Mischung von konzentrierter Schwefelsäure und 20 %iger Natriumbichromatlösung. Eine Trennung der Oocysten mit noch nicht abgerundeten Sporonten (unreife Oocysten) von denjenigen mit vollabgerundeten Sporonten (reife Oocysten) erreichten sie schließlich durch eine Flotation in 20 %iger Kochsalzlösung (spezifisches Gewicht = 1,31).

Zur Aufbewahrung und Sporulation der Oocysten wird seit den Untersuchungen von WASIELEWSKI's (1904) als sporulationsförderndes, keimhemmendes und zugleich unschädliches Medium im allgemeinen Kaliumbichromat in 2 bis 2,5 %iger Lösung verwendet. GOODRICH (1944) schlug später hierfür auch eine 1 %ige Chromsäurelösung vor.

Die zahlreichen Literaturangaben über den Einfluß der Temperatur auf die Sporulation von Coccidienoocysten sind in Tabelle 1 zusammengefaßt wiedergegeben.

Tabelle 1

Einfluß der Temperatur auf die Sporulationsfähigkeit und die Sporulation
von Coccidienocysten.

Temperatur o C	in Coccidienart*)	Wirt	Einwirkungs- dauer	★★)	beobachtete Auswirkung	***)	Autor
-30	E. zuerni	Rind	6 h		Spfk.um 63% verm.		MARQUARDT et al. (1960)
-30, -29	m. Arten	Haushuhn	24 h		Spfk.um 95% verm.		LANDERS (1953)
-19	m. Arten	Haushuhn	24 h		Spfk. erhalten		LANDERS (1953)
-7 bis -8	E. zuerni	Rind	2 Wo		Spfk.um 8% verm.		MARQUARDT et al. (1960)
			8 Wo		Spfk.um 26% verm.		
-4,5	E. scabra	Schwein	5 Mo		Spfk.um 50% verm.		AVERY (1942)
	E. deblickei	Schwein	o. A.		Spfk. erhalten		AVERY (1942)
0 bis +5	E. arloingi	Schaf	o. A.		Sp. verzögert		CHRISTENSEN (1939)
0 bis +2,5	E. labbeana	Taube	30 T		Spfk. n. erhalten		DUNCAN (1959)
+3 bis +4	E. labbeana	Taube	60 T		Spfk. n. erhalten		DUNCAN (1959)
+4	E. acervulina	Haushuhn	34 T		Spfk. verm.		WILSON, FAIRBAIRN (1961)
+ 4,4	E. tenella	Haushuhn	48 h		Spfk. erhalten		ELLIS (1938)
+ 8	E. zuerni	Rind	m. Mo		100 % Sp.		MARQUARDT et al. (1960)
+13 bis +32	E. zuerni	Rind	o. A.		100 % Sp.		MARQUARDT et al. (1960)
+20	E. zuerni	Rind	65 h		50 % Sp.		MARQUARDT et al. (1960)
	E. nieschulzi	Ratte	66 h		100 % Sp.		MARQUARDT, KALLOOR (1960)
+20 bis +25	E. arloingi	Schaf	o. A.		Sp. normal		CHRISTENSEN (1939)

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Temperatur in ° C	Coccidienart ^(*)	Wirt	Einwirkungs- dauer	beobachtete Auswirkung ^(**)	Autor
+25	E. zuerni	Rind	36 h	50 % Sp.	MARQUARDT et al. (1960)
+25	E. magna	Kaninchen	84 h	50 % Sp.	BECKER (1931)
+ 26 bis +32, 2	E. tenella	Kaninchen	48 h	50 % Sp.	BECKER (1931)
+28, +29	E. meleagridis	Haushuhn	o. A.	optimale Sp.	ELLIS (1938)
		Truthuhn	15 h	100 % Sp.	EDGAR (1955)
	E. acervulina	Haushuhn	17 h	100 % Sp.	EDGAR (1955)
	E. tenella	Haushuhn	18 h	100 % Sp.	EDGAR (1955)
	E. hoganii	Haushuhn	18 h	100 % Sp.	EDGAR (1955)
	E. mitis	Haushuhn	18 h	100 % Sp.	EDGAR (1955)
	E. necatrix	Haushuhn	18 h	100 % Sp.	EDGAR (1955)
	E. adenoides	Truthuhn	18 h	100 % Sp.	EDGAR (1955)
+28 bis +30	E. tenella	Haushuhn	o. A.	optimale Sp.	HORTON, SMITH (1947)
+30	E. nieschulzi	Ratte	o. A.	normale Sp.	MARQUARDT, KALLOOR (1962)
+32	E. nieschulzi	Ratte	o. A.	Spfk. um 61% verm.	MARQUARDT, KALLOOR (1962)
	E. arloingi	Schaf	o. A.	Sp. atypisch	CHRISTENSEN (1939)
+33	E. magna	Kaninchen	48 h	100 % Sp.	BECKER (1931)
	E. perforans	Kaninchen	72 h	80 % Sp.	BECKER (1931)
+35 bis +37	E. zuerni	Rind	o. A.	Spfk. n. erhalten	MARQUARDT et al. (1960)
+35 bis +50	E. magna	Kaninchen	72 h	Spfk. n. erhalten	BECKER (1931)
	E. perforans	Kaninchen	72 h	Spfk. n. erhalten	BECKER (1931)
+40	E. arloingi	Schaf	3 T	Spfk. n. erhalten	CHRISTENSEN (1939)
	E. scabra	Schwein	o. A.	normale Sp.	AVERY (1942)
	E. deblickei	Schwein	o. A.	normale Sp.	AVERY (1942)

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Temperatur in ° C	Coccidienart ^{*)}	Wirt	Einwirkungs- dauer	beobachtete ^{**) (***)} Auswirkung	Autor
+50	E. tenella	Haushuhn	1 1/2 h	Abtötung	FISH (1931)
+51	E. magna	Kaninchen	10 Min.	Abtötung	BECKER (1931)
+55	E. tenella	Haushuhn	3 Min.	Abtötung	FISH (1931)

^{*)}
Normenklatur nach PELLERDY (1965)

^{**) (***)}
o. A. = ohne Zeitangabe, T = Tage, Wo. = Wochen, Mo. = Monate, m. = mehrere

^{***)}
Spfk. = Sporulationsfähigkeit, Sp. = Sporulation, verm. = vermindert, n = nicht

Aus den vielfältigen Angaben kann man entnehmen, daß sich als günstigste Temperatur zur Aufbewahrung von Oocysten über eine längere Zeit, ohne daß im allgemeinen eine Sporulation eintritt, der Temperaturbereich von -5 bis $+4^{\circ}\text{C}$ erwiesen hat. Lediglich die Untersuchungen von CHRISTENSEN (1939), der bei E. arloingi noch eine langsame Sporulation im Temperaturbereich von 0 bis $+5^{\circ}\text{C}$ feststellen konnte, stehen diesen allgemeinen Erfahrungen entgegen. Aus der Tabelle ist weiterhin ersichtlich, daß der optimale Temperaturbereich für die Sporulation bei den meisten Coccidienarten zwischen $+20$ und $+32^{\circ}\text{C}$ liegt.

Über die Notwendigkeit der Anwesenheit von Sauerstoff bei der Sporulation besteht heute Übereinstimmung. Schon PFEIFFER (1892), METZNER (1903) und von WASIELEWSKI (1904) stellten in ihren Versuchen fest, daß Luft- bzw. Sauerstoffzutritt für die Sporulation von Coccidienoocysten notwendig ist. METZNER (1903) beobachtete außerdem, daß ein längerer Aufenthalt in einer Atmosphäre von Kohlendioxyd allmählich über eine atypische Sporulation zum Absterben der Oocysten führt.

HENRY (1931) gibt an, daß Oocysten von E. scabra noch bei geringem Sauerstoffzutritt sporulierfähig sind. Nach CHEISSIN (1935) ist am Anfang und Ende der Sporulation von Oocysten von E. magna und E. stiedai die Anwesenheit von Sauerstoff unbedingt notwendig. Die Zwischenstadien können Sauerstoff entbehren, entwickeln sich dabei jedoch nur langsam weiter.

In Versuchen mit verschiedenen Eimeria-Arten kamen zahlreiche weitere Autoren wie LAPAGE (1940, AVERY (1942), GOODRICH (1944), SMITH und HERRICK (1944), DUNCAN (1959), WILSON und FAIRBAIRN (1961), DÜRR und PELLERDY (1969) sowie WAGENBACH und BURNS (1969) zu dem Ergebnis, daß Sauerstoff für die Sporulation unbedingt erforderlich ist. Nach MARQUARDT, SENGER und SEGHETTI (1960) sporulieren die Oocysten von E. zuerni normal in einer Sauerstoffatmosphäre, in der nur 10 % der in der Luft enthaltenen Sauerstoffmenge vorhanden sind. MARQUARDT und KALLOOR (1962/63) stellten fest, daß ein Gemisch von 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxyd, im Vergleich zur normalen Luft, den Sporulationsverlauf von E. nieschulzi-Oocysten nicht zu beeinflussen vermag, aber daß reiner Sauerstoff den

Sporulationsbeginn verzögert und die Sporulationsdauer verlängert.

Obleich sich so viele Untersuchungen mit der Notwendigkeit dieses Gases für die Sporulation der Oocysten von Coccidien beschäftigt haben, wurde der tatsächliche Sauerstoffverbrauch während und nach der Sporulation nur in wenigen Arbeiten quantitativ gemessen. SMITH und HERRICK (1944) untersuchten Oocysten von E. tenella manometrisch und fanden, daß während ihrer Sporulation in den ersten zehn Stunden der Sauerstoffverbrauch zwischen 11,3 und 15,5 $\mu\text{l}/10^6$ Oocysten/Stunde schwankt, um in der elften und zwölften Stunde auf 26,0 bzw. 35,2 $\mu\text{l}/10^6$ Oocysten/Stunde zu steigen. Der Sauerstoffverbrauch der Oocysten in der 48. Stunde betrug 0,4 $\mu\text{l}/10^6$ Oocysten/Stunde und entsprach dem anderer versporter E. tenella-Oocysten. Eine Schwankung des pH-Wertes der Oocystensuspensionen im Bereich von 1,3 bis 8,8 hatte keinen Einfluß auf den Sauerstoffverbrauch. WILSON und FAIRBAIRN (1961) führten ähnliche Versuche an Oocysten von E. acervulina durch. Der Sauerstoffverbrauch in der ersten Stunde betrug 3,5 $\mu\text{l}/10^6$ Oocysten. In den folgenden 23 Stunden nahm er gleichmäßig bis auf 0,6 $\mu\text{l}/10^6$ Oocysten/Stunde ab. In der 68. Stunde war der Sauerstoffverbrauch auf 0,24 $\mu\text{l}/10^6$ Oocysten/Stunde zurückgegangen. Die Kohlendioxydabgabe in den ersten zehn Stunden war größer als die Sauerstoffaufnahme, woraus sich ein Respiratorischer Quotient (RQ) von 1,12 ergab. Im Anschluß an diese Zeit betrug der RQ 0,8 bis 0,9. Sowohl die Zahl der sporulierenden Oocysten als auch der Sauerstoffverbrauch verringerten sich bei Oocysten, die 34 Tage lang im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt worden waren.

DÜRR und PELLERDY (1969) bestimmten den Gesamtsauerstoffverbrauch der Oocysten von E. stiedai während einer Sporulationsdauer von 72 Stunden und geben dafür Werte von 30,2 + 2,3 μl und 39,5 + 4,0 $\mu\text{l}/10^5$ sporulationsfähige Oocysten an.

Genauere polarographisch durchgeführte Sauerstoffmessungen bei E. tenella und E. stiedai, die sie in Korrelation mit dem Entwicklungsgeschehen während der Sporulation setzten, wurden neuerdings (nach Abschluß der eigenen experimentellen Arbeiten) von WAGENBACH und BURNS (1969) veröffentlicht. Bei beiden Coccidienarten war der Sauerstoffverbrauch über die ganze Sporulationsdauer nicht konstant,

sondern zeigte nach einem anfänglichen hohen Wert, kurze Zeitabschnitte, in denen er vorübergehend auf z. T. wesentlich geringere Werte abfiel.

Ausgehend von diesen Angaben sollten die eigenen Untersuchungen Aufschluß darüber geben, wie hoch der Gesamtsauerstoffverbrauch bei Oocysten von Eimeria stiedai unterschiedlicher Herkünfte und nach verschiedenen langen Aufbewahrungszeiten während und nach der Sporulation ist, und wie die Sauerstoffverbrauchskurven in Relation zum Sporulationsgeschehen verlaufen.

III. Material und Methode

A. Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Zur Lösung der gestellten Aufgaben erwies es sich als notwendig, zunächst einmal die Frage des Einflusses unterschiedlicher Konzentrationen von Kalilauge auf die Coccidienoocysten und das umgebende Lebergewebe, sowie die Wirksamkeit verschiedener Aufbewahrungsmedien insbesondere hinsichtlich ihrer keimhemmenden Eigenschaften zu überprüfen.

1. Gewinnung und Reinigung der Oocysten

Zur Prüfung der Wirkung von Kalilauge auf E. stiedai-Oocysten, verunreinigendes Lebergewebe und auf die anschließende Sporulationsrate wurden Oocysten von E. stiedai in homogenisiertem Lebergewebe stark infizierter Kaninchen in 5-, 7-, 10- und 20 %iger⁺⁾ Kalilauge suspendiert. In Zeitabständen von 15, 30, 60 und 120 Minuten, sowie 20, 24, 48 und 76 Stunden wurden hiervon Proben entnommen, die Kalilauge ausgewaschen und die Oocysten in 2 %iger Kaliumbichromatlösung zur Sporulation angesetzt. Die Einwirkung der Kalilauge

+)

1 Gewichtsanteil doppelkonzentrierter Kalilauge (g KOH + Aqua dest. ad 100 g) + 1 Gewichtsanteil Leberhomogenat.

auf die Oocysten und das Lebergewebe wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Sporulationsrate (% der vollsporulierten Oocysten von allen nach dem Auswaschen der Kalilauge noch vorhandenen Oocysten) wurde 72 Stunden nach der Entnahme bestimmt.

Zur Prüfung der Wirksamkeit verschiedener Aufbewahrungsmedien auf die Sporulation von E. stiedai-Oocysten und den Keimgehalt der Suspensionen wurden Oocysten von E. stiedai (Leberausspülung und Leberverreibung mit und ohne Kalilaugebehandlung (s. Seite 10) in den unten angeführten Flüssigkeiten drei Wochen lang bei einer Kühlschranktemperatur von ca. $+3^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Danach wurden sie in diesen Medien zur Sporulation angesetzt und nach drei Tagen auf ihre Sporulationsfähigkeit sowie anschließend auf ihren Keimgehalt untersucht.

Die Testmedien waren reines Wasser (abgestandenes Leitungswasser) und solches, dem jeweils 2 % Kaliumbichromat; 20 mg/ml Hostamycin[®] (Farbwerke Hoechst); eine wassersuspendierbare Kombination von Penicillin G-Natrium, Procain-Penicillin G und Streptomycin im Verhältnis 1:4:5; Merthiolat⁺ (Firma Serva, Heidelberg) in einer Verdünnung von 1:10.000 bzw. 1000 I.E./ml Trichomycin[®] (Firma Chemie Grünenthal GmbH., Stolberg/Rhld.) zugesetzt war.

Zur Gewinnung der Oocysten von E. stiedai wurden Kaninchen im Alter von ca. 4 Wochen mit 50.000 bis 60.000 Oocysten einer E. stiedai-Reinkultur pro Tier infiziert. Je 5 bis 6 Kaninchen wurden für die Vorversuche am 21. Tag und für die Hauptversuche am 23. Tag p.i. getötet. Die Oocysten wurden dann aus den verschiedenen Geweben und Organanteilen wie folgt gewonnen und gereinigt, wobei automatisch eine gründliche Vermischung der Oocysten aller Tiere erfolgte.

Aus der Gallenblase:

Die Gallenblase wurde sofort nach der Tötung der Tiere isoliert, geöffnet und ausgespült. Der ausgewaschene Inhalt wurde wiederholt mit Wasser verdünnt und durch Abzentrifugieren von Gallenbestandteilen befreit. Anschließend wurden durch Siebe, deren Maschenweite 250μ und 80μ betrug, gröbere Bestandteile aus der Suspension entfernt und die Oocysten erneut abzentrifugiert.

⁺) Cialit

Aus den Gallengängen:

Die großen Gallengänge wurden aufgeschnitten und mit Wasser aus einer Spritzflasche ausgewaschen. Die so erhaltene Oocystensuspension ("Leberausspülung") wurde wie oben geschildert weiter behandelt.

Aus dem Lebergewebe:

Das Lebergewebe wurde nach Zerkleinerung durch ein grobmaschiges Sieb passiert ("Leberverreibung") und anschließend in 20 %iger^{*)} Kalilauge 15 Minuten lang stehengelassen. Danach wurde die Einwirkung der Kalilauge durch eine fünffache Verdünnung mit Wasser unterbrochen. Die Suspension wurde anschliessend sofort abzentrifugiert und mehrmals mit Wasser ausgewaschen bis ein pH-Wert von ca. 7 (gemessen mit Merk-Indikator-Papier) erreicht war. Die weitere Behandlung erfolgte wieder wie oben geschildert.

Aus dem Darm:

Die Oocysten wurden aus dem Abfangsteil des Duodenums durch Auswaschen ("Darmauswaschung") gewonnen. Der ausgespülte Inhalt wurde mikroskopisch daraufhin geprüft, ob außer E. stiedai-Oocysten eventuell noch andere unerwünschte Oocysten von Darmccoccidienarten vorhanden waren. Eine Verwendung erfolgte nur, wenn dies ausgeschlossen werden konnte. Futterbestandteile wurden durch ein grobmaschiges Sieb und wiederholtes Auswaschen durch Siebe mit 250 µ und 80 µ Maschenweite entfernt.

Die vier auf diese Weise erhaltenen Oocystensuspensionen wurden abzentrifugiert, das Sediment in gesättigter Kochsalzlösung zehn Minuten lang flotiert und anschließend hochtourig abzentrifugiert. Die Oocysten- "Rahm" -Schicht wurde mit einem Spatel abgehoben bzw. mit einer Spritze abgesaugt und nochmals in Kochsalz flotiert. Anschließend wurden die Oocysten dreimal mit Wasser ausgewaschen und erneut mit einem 80 µ Sieb von noch verbliebenen größeren Verunreinigungen und Oocystenzusammenballungen befreit, noch einmal abzentrifugiert und in 2 %iger Kaliumbichromatlösung resuspendiert. Die Oocystensuspensionen waren nach dieser Behandlung so sauber,

*) 1 Gewichtsanteil 40%iger Kalilauge + 1 Gewichtsanteil Lebergewebssuspension

daß auf eine Dichte-Gradienten-Zentrifugation verzichtet werden konnte.

2. Standardisierung der Oocystensuspensionen

Die Oocysten wurden mit Hilfe eines Haemocytometers (Jessen-Kammer) ausgezählt, wobei für alle Versuche dasselbe Haemocytometer benutzt wurde. Nach dieser ersten Dichtebestimmung wurden die vier Cocystensuspensionen mit 2 %iger Kaliumbichromatlösung so weit verdünnt, daß die gewünschte Endkonzentration theoretisch etwa erreicht war und danach erneut exakt ausgezählt. Die weitere Aufbewahrung dieses endgültigen Versuchsmaterials erfolgte im Kühlschrank bei einer Temperatur von ca. +3°C.

B. Manometrische Untersuchungen

Die Sauerstoffverbrauchsmessungen erfolgten nach der direkten Warburgmethode (WARBURG (1920/21/23), zit. bei KLEINZELLER (1965)) mit einem Warburgapparat (Typ F 127 L) der Firma Braun-Melsungen.

1. Versuchsbedingungen

Es wurden die üblichen 13 ml Reaktionsgefäße in der Normalausführung (NS 14,5) benutzt. Die Oocysten waren in 2 ml 2 %iger Kaliumbichromatlösung suspendiert. Für die Kohlendioxydabsorption wurden 0,2 ml einer 10 %igen Kalilauge und ein Stück gefaltetes Filtrierpapier in das zentrale Einsatzgefäß des Reaktionsgefäßes gebracht. Zwei Gefäße, bei allen Versuchen jeweils dieselben, dienten als Thermobarometer. In vier zusätzlich an der Schüttelvorrichtung angebrachten 50 ml-Plastikgefäßen waren Oocysten für die Sporulationskontrolle vorhanden. Es wurde eine Schüttelfrequenz von ca. 80/Minute bei einer Schüttelamplitude von 4 cm verwendet. Der Apparat wurde vor jedem Versuch 30 Minuten lang auf die Versuchstemperatur von +28°C äquilibriert. Die Versuchsdauer betrug bei den Versuchen mit sporulierenden Oocysten jeweils 96 Stunden, bei denjenigen mit versporteten Oocysten 72 Stunden bzw. einmal

(Vers. III₄) 48 Stunden. Nach jedem Versuch wurde eine bakteriologische Untersuchung des Gefäßinhaltes durchgeführt.

2. Versuchsanordnung

In zwei Vorversuchen wurde unter Verwendung des gleichen Materials, am ersten und sechsten Tag nach der Tötung der Kaninchen beginnend, in jeweils drei Reaktionsgefäßen der Sauerstoffverbrauch der sporulierenden Mithilfe von vier verschiedenen Isolierungsmethoden: Leberverreibung (LV), Leberausspülung (LA), Gallenblasenausspülung (GB) und Darmauswaschung gewonnenen Oocysten gemessen.

Die Zahl der eingegebenen Oocysten betrug im ersten Versuch ca. eine Million, im zweiten Versuch ca. zwei Millionen. Infolge der großen Oocystenmenge wurde es notwendig, zu Beginn etwa alle sechs Stunden später in etwas größeren Abständen, einen Druckausgleich mit der Außenluft herzustellen, um ein durch den hohen Sauerstoffverbrauch bedingtes Absinken der abzulesenden Manometersperrflüssigkeit unter die niedrigste Markierung auszugleichen. Die Ablesungen des Sauerstoffverbrauches erfolgten stündlich. Das Fortschreiten der Sporulation wurde zweistündlich durch Probeentnahme aus den zusätzlich angebrachten Plastikgefäßen kontrolliert.

Die Hauptversuche wurden in drei Versuchsreihen durchgeführt. In den beiden ersten Versuchsreihen wurde der Sauerstoffverbrauch der sporulierenden Mithilfe der vier verschiedenen, oben angeführten, Isolierungsmethoden gewonnenen Oocysten in jeweils drei Parallelversuchen in Abhängigkeit von der Aufbewahrungszeit (in sechstägigen Abständen) bestimmt.

Der Beginn der Einzelversuche jeder Versuchsreihe (I₁₋₆ und II₁₋₆) lag am 1. (1), 6. (2), 12. (3), 18. (4), 24. (5) und 30. (6) Tag nach Tötung der verwendeten Kaninchen. Die Anzahl der Oocysten pro Gefäß betrug in der ersten Versuchsreihe (Versuche I₁₋₆) bei Material aus der Leberverreibung 125.000, aus der Leberausspülung 136.000, aus der Gallenblasenausspülung 138.000 und aus der Darmauswaschung 178.000; in der zweiten Versuchsreihe (Versuche II₁₋₆) bei Material aus der Leberverreibung 161.000, aus der Leberausspü-

lung 108.000, aus der Gallenblasenausspülung 129.000 und aus der Darmauswaschung 132.000. Die Ablesung des Sauerstoffverbrauches erfolgte in der nullten, 6., 12., 24., 30., 36., 48., 54., 60., 72., 84. und 96. Stunde. Die Sporulationsstadien wurden alle zwölf Stunden differenziert.

In der dritten Versuchsreihe (Versuche III₁₋₄) wurde der Sauerstoffverbrauch sporulierter Oocysten in Abhängigkeit von der Zeit nach der Sporulation gemessen. Dabei wurden Oocysten unmittelbar nach ihrer Sporulation in Warburg-Reaktionsgefäßen (72 Stunden nach Ansetzen der Sporulation) (Versuch III₁), sowie Oocysten, die nach einer 72-stündigen Sporulation in Warburg-Reaktionsgefäßen 100 Stunden (= ca. 4 Tage) (Versuch III₂) bzw. nach einer dreitägigen Sporulation in Petrischalen fünf Tage lang (Versuch III₃) bei Zimmertemperatur (20 - 22 ° C) aufbewahrt worden waren, verwendet. In einem letzten Versuch (Versuch III₄) wurden schließlich Oocysten verwendet, die nach ihrer Sporulation 90 Tage im Kühlschrank bei ca. +3°C gestanden hatten. In jedem Versuch dieser Reihe wurden jeweils sechs Reaktionsgefäße benutzt. Bei Versuch III₁ waren es je drei Gefäße mit Oocysten zwei verschiedener Isolierungsmethoden. Die Oocystenmenge pro Gefäß betrug bei Versuch III₁ 136.000 (zu 94,0 % versport) bzw. 178.000 (zu 97,7 % versport), bei Versuch III₂ 520.000 (zu 92,6 % versport), bei Versuch III₃ 960.000 (zu 96,5 % versport) und bei Versuch III₄ 3.620.000 (zu 98,0 % versport). Die Ablesung des Sauerstoffverbrauches erfolgte in zwölfstündigen Abständen. Eine weitere Sporulationskontrolle erfolgte nicht.

3. Berechnungs- und Auswertungskriterien

Für die Berechnung der zur Auswertung benötigten Gefäßkonstanten des Warburg-Systems wurde der Bunsen'sche Absorptionskoeffizient von Sauerstoff in Wasser bei 28°C zugrunde gelegt.

In allen angegebenen Ergebnissen wurden die Sauerstoffverbrauchswerte auf jeweils 100.000 Oocysten umgerechnet.

Als Sporulationskriterien wurden der Sporulationsgrad und der

Sporulations-Index nach KOTLAN und PELLERDY (1934) ⁺⁾ verwendet. Beide wurden durch Auszählung von je 300 Oocysten aus jedem Sporulationskontrollgefäß und entsprechende prozentuale Umrechnungen ⁺⁺⁾ bestimmt.

Im Verlauf der Vorversuche stellte sich heraus, daß die Einteilungskriterien der Indexbestimmung nach KOTLAN und PELLERDY (1934) für die eigenen Zwecke der Korrelation des Sauerstoffverbrauches mit dem Sporulationsverlauf offensichtlich nicht völlig ausreichend sind. Es wurde deshalb das Pyramidenstadium nach PELLERDY (1965) noch einmal in die folgenden zwei Stadien unterteilt:

- a). erste sichtbare Gestaltsveränderung des runden Sporonten mit Ausbildung von Kanten und Winkeln;
- b). das deutliche Pyramidenstadium.

Zur Indexbestimmung wurden diese beiden Stadien jedoch zusammen als Pyramidenstadien gewertet.

⁺⁾
Grundlage dieser Sporulationsindexbestimmung bei Eimeria-Arten sind folgende Stadien:

Stadium 0: Oocysten mit völlig abgerundeten Sporonten ohne Anzeichen einer Sporulation.

Stadium 1: Oocysten im Pyramidenstadium (s. PELLERDY, 1965, S. 27).

Stadium 2: Oocysten mit vier voneinander abgegrenzten Sporoblasten.

Stadium 3: Umwandlung der runden Sporoblasten in ovale Sporocysten.

Stadium 4: Deutlich erkennbare Sporozoiten in den Sporocysten.

Zur Indexbestimmung werden 100 Oocysten ausdifferenziert. Die Zahl der Oocysten in jedem Stadium wird dann mit der Stadiumsziffer multipliziert und die Summe aus diesen Produkten als Sporulationsindex angegeben. Maximal erreichbar ist also ein Sporulationsindex von $100 \times \text{Stadium } 4 = 400$.

⁺⁺⁾
Taube Oocysten wurden nicht berücksichtigt. Bei einer Differenzierung von 300 Oocysten wurde die Zahl der sporulationsfähigen Oocysten gleich 100 % gesetzt.

Folgende Definitionen wurden benutzt:

"Eingegebene Oocysten": Gesamtzahl der einpipettierten Oocysten in der verwendeten Suspension, d. h. sowohl unreife Oocysten mit nicht kontrahierten Sporonten (bei Versuchsende als "taub" bezeichnet) als auch scheinbar sporulationsfähige Oocysten mit vollabgerundeten Sporonten.

"Sporulationsfähige Oocysten": Oocysten mit vollabgerundeten Sporonten sowie alle Oocysten, die sich eventuell weiterentwickelt haben, d. h. alle Oocysten der Stadien 0 bis 4 des Indexbestimmungs-Schemas nach KOTLAN und PELLERDY (1934) (s. Fußnote S. 14).

"Sporulierte Oocysten": Diejenigen Oocysten, die sich in den Stadien 1 bis 4 des Indexschemas zum Zeitpunkt des jeweiligen Versuchsendes befanden. Die Stadien 1 bis 3 waren allerdings nur wenig vertreten.

"Sporulationsgrad": Prozentsatz der sporulierten Oocysten, bezogen auf die eingegebenen Oocysten.

Der Fehler bei der Dichtebestimmung der Oocystensuspensionen mit dem Haemocytometer und bei der Indexbestimmung wurde durch zehnmaliges Ermitteln dieser Werte bei ein und demselben Material festgestellt.

Ein Vergleich der Ergebnisse des Sauerstoffverbrauches während der Sporulation, bezogen auf die Herkunft der Oocysten und ihre Aufbewahrungsdauer, wurde mittels der Varianzanalyse und des t-Testes durchgeführt.

IV. Ergebnisse

A. Ergebnisse der methodischen Voruntersuchungen

1. Die Wirksamkeit von Kalilauge zur Reinigung von E. stiedai, Oocysten und ihr Einfluß auf die Sporulation (Tab. 2).

Bei den Untersuchungen zur Überprüfung der reinigenden Wirkung von Kalilauge zur Gewinnung reiner Oocystensuspensionen stellte sich heraus, daß fünfprozentige Kalilauge zu einer befriedigenden Zerstörung des Lebergewebes, in dem die Oocysten suspendiert waren, etwa 48 Stunden benötigte. Dieselbe Wirkung konnte bei einer schrittweisen Verstärkung der Konzentration der Kalilauge auf schließlich 20 % bereits nach 15 Minuten erzielt werden.

Der gleiche Reinigungseffekt (Zerstörung des Lebergewebes bis auf geringe Detritusmassen) wurde mit 10 %iger Kalilauge in 30 Minuten erreicht. Da jedoch die Oocysten nach dieser Zeit bei Verwendung von 10 %iger Kalilauge infolge eines noch vorhandenen Schleimgehaltes der Suspension beim Auswaschen irreversibel verklumpten, während eine geringe, bei Verwendung 20 %iger Kalilauge, noch auftretende Verklumpung durch wiederholtes Auswaschen, Durchsieben und Abzentrifugieren zu beseitigen war, wurde in allen weiteren Versuchen stets 20 %ige Kalilauge angewandt. Die verbliebenen Detritusmengen, ebenso wie ein großer Teil der tauben Oocysten, konnten durch ihre Sedimentation bei den nachfolgenden Flotationen mit gesättigter Kochsalzlösung (s. S. 10) gleichzeitig entfernt werden.

Tabelle 2

Reinigungsgrad und Sporulationsrate der mit Kalilauge unterschiedlicher Konzentrationen behandelten E. stiedai-Oocystensuspensionen.

Konzentration der Kalilauge	5 %		7 %		10 %		20 %	
Behandlungs- dauer	RG ^{*)}	SR ^{**)}	RG	SR	RG	SR	RG	SR
15 Min.	+ DDD	69	+ DDD	55	+ DD	49	++ D	60
30 Min.	+ DDD	73	+ DD	55	+ D	53	++	60
60 Min.	+ DD	63	+ D	42	+	48	++	63
120 Min.	+ DD	60	+ D	56	+	61	+++	61
20 h	+ D	60	++	69	++	65	+++ \$	63
24 h	+	56	+++	81	+++	72	+++ \$\$	56
48 h	++	74	+++	62	+++	87	+++ \$\$\$	53
76 h	+++	31	+++	52	+++ \$\$\$\$	--	+++ \$\$\$\$\$	--

- *) RG = Reinigungsgrad (geschätzt)
 D = geringe Menge Detritus
 DD = mittlere Menge Detritus
 DDD = große Menge Detritus
 + = Oocysten sind verklumpt und schleimig
 ++ = Oocysten sind verklumpt aber leicht trennbar (nicht schleimig)
 +++ = Oocysten sind nicht verklumpt
 \$ = wenig leere Oocystenhüllen
 \$\$ = mäßige Anzahl leerer Oocystenhüllen
 \$\$\$ = zahlreich leere Oocystenhüllen
 \$\$\$\$ = massenhaft leere Oocystenhüllen

- **) SR = Sporulationsrate (Prozentsatz der vollsporulierten Oocysten von den durch Kalilauge nicht zerstörten Oocysten.

Die unversporten Oocysten wurden von 20 %iger Kalilauge bei einer Einwirkungszeit bis zu zwei Stunden offensichtlich nicht beeinflusst. Erst bei längerer Einwirkung dieser Konzentration traten in zunehmendem Maße immer zahlreicher leere, zerstörte Oocystenhüllen auf. In 10 %iger Kalilauge zeigten sich nach 76 Stunden die gleichen Erscheinungen, während bei den Oocysten in 5 %iger Kalilauge selbst nach dieser Zeit noch keine morphologischen Veränderungen festzustellen waren.

Die anschließende Sporulation der jeweils überlebenden Oocysten war bis zu einer Einwirkungszeit von 48 Stunden unverändert. Nach 76-stündiger Einwirkung von 10- und 20 %iger Kalilauge konnte die Sporulationsrate (s. S. 8) auf Grund der nur noch geringen Anzahl unzerstörter Oocysten nicht mehr ermittelt werden. Oocysten, die 76 Stunden in 7 %iger Kalilauge gelegen hatten, sporulierten unverändert gut, während die Sporulationsrate der Oocysten, die nach 76 Stunden aus der 5 %igen Kalilauge gewonnen wurden, deutlich schlechter war.

2. Der Einfluß verschiedener Aufbewahrungsmedien auf die Sporulation der E. Stiedai-Oocysten und auf den Keimgehalt der Oocystensuspensionen (Tab. 3).

Sowohl Hostamycin[®] als auch Kaliumbichromat waren in den geprüften Konzentrationen von 20 mg/ml bzw. 2 % in der Lage, alle drei Oocystensuspensionen über 21 Tage im Kühlschrank sowie drei weitere Tage bei Zimmertemperatur keimfrei zu halten. Die Sporulation war nicht beeinträchtigt.

Tabelle 3

Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung und Sporulationskontrolle der Oocysten von E. stiedai in verschiedenen Aufbewahrungsmedien.

Aufbewahrungs- medien	Hostamycin ^(a) (20 mg/ml)		Kaliumbichromat (2 %)		Trichomycin ^(b) (1.000 I.E./ml)		Cialit ^(c) (1:10.000)		Leitungswasser
	BU [*]	SG ^{**}	BU	SG	BÜ	SG	BU	SG	
Herkunft der Oocysten									
Leberausspülung	neg	97 %	neg	98 %	+++	33 %	+++	20 %	57 %
Leberverreibung ohne KOH-Behand- lung	neg	96 %	neg	95 %	+++	30 %	+++	25 %	40 %
Leberverreibung mit KOH ^{***}) behandelt	neg	97 %	neg	97 %	+++	50 %	+++	37 %	62 %

^{*}) BU = Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung

neg = Kein Bakterienwachstum

+++ = Sehr zahlreich Kolonien gram-negativer Stäbchen. Eine weitere Differenzierung erfolgte nicht.

^{**}) SG = Sporulationsgrad (s. S. 14)

^{***}) Die Oocysten wurden 60 Minuten lang mit 20 %iger Kalilauge behandelt.

In den Suspensionsflüssigkeiten der Oocysten, die einen Zusatz von 1:10.000 Cialit[®] und 1000 I.E. Trichomycin[®] enthielten bzw. nur aus Leitungswasser bestanden, konnten bei den bakteriologischen Untersuchungen im Anschluß an die Sporulation sehr zahlreiche Bakterienkolonien nachgewiesen werden. Die Sporulationsergebnisse der Kulturen in den Cialit[®] und Trichomycin[®]-Lösungen waren bei den Oocysten aus der Leberausspülung und aus der Leberverreibung ohne Kalilaugebehandlung sehr schlecht. Die aus der Leberverreibung mit anschließender Kalilaugebehandlung gewonnenen Oocysten sporulierten etwas besser.

Die in Leitungswasser gehaltenen Oocysten sporulierten ebenfalls etwas besser. Auch hier waren die besten Sporulationsergebnisse bei den Oocysten aus der Leberverreibung mit nachträglicher Kalilaugebehandlung zu verzeichnen.

3. Ergebnisse der Fehlerbestimmungen

Bei der Auszählung der Oocysten mit dem Haemocytometer betrug der Variationskoeffizient bei einer Dichte von ca. 150.000 Oocysten/ml Flüssigkeit 10 % und bei der Bestimmung des Sporulationsindex bei einem Index von ca. 390 etwa 1,5 %. Der Ablesefehler der Manometer kann bei einer Ablesegenauigkeit von 1 mm bei einer Gesamtablesung von 20 - 100 mm Druckdifferenz mit ca. 1 - 5 % angenommen werden. Der Pipettenfehler beim Einpipettieren in die Reaktionsgefäße lag bei der Benutzung einer 1 ml Enzympipette unter 1 %. Durch Addition der Einzelfehler nach der Formel $V_g^2 = V_2^2 + V_2^2 + \dots + V_n^2$ ergibt sich daraus ein methodischer Gesamt-Fehler von ca. 11 %, mit dem in jedem Einzelfall gerechnet werden muß.

B. Ergebnisse der manometrischen Versuche

1. Vorversuche zur Ermittlung des Sporulationsverlaufes (Tab.4u.5).

Bei den ersten zwei Warburgversuchen mit der etwa zehnfachen Menge der später verwendeten Oocysten stellte sich heraus, daß die erhoffte Synchronisation des Sporulationsverlaufes nicht vorlag. Nach

einer "Ruhezeit" von etwa zwölf Stunden, während der keine morphologischen Veränderungen beobachtet werden konnten, folgten innerhalb von sechs Stunden die ersten der in der Differenzierung benutzten Stadien des Kantigwerdens des Sporonten bis zur Ausbildung der länglichen Sporocysten. Eine beginnende Ausbildung der Sporozoiten konnte schon zwei bis drei Stunden später beobachtet werden. Die ersten voll ausgebildeten Sporozoiten wurden in der 25. Stunde bei sechs Tage alten Oocysten bzw. in der 30. Stunde bei einen Tag alten Oocysten gesehen. Nach 48 Stunden war die Sporulation in beiden Versuchen morphologisch weitgehend beendet. Bis zum Versuchsende in der 72. Stunde traten nur noch geringfügige Verschiebungen zwischen den einzelnen Sporulationsstadien auf.

Die Tabellen 4 und 5 stellen einen Auszug aus den Originalprotokollen dar. Die bei den Auszählungen mitberücksichtigten tauben Oocysten wurden darin weggelassen, weshalb die Summe der angegebenen Prozentsätze niemals auf 100 zu bringen ist. Die Schwankungen in den Endsummen sind durch die "tauben" Oocysten bedingt, die entweder durch nachträgliche Reifungsvorgänge zu sporulationsfähigen Oocysten werden können oder durch Degeneration aus diesen entstehen.

In der zeitlichen Aufeinanderfolge der einzelnen Stadien waren zwischen den beiden Versuchen keine wesentlichen Unterschiede festzustellen. Es fiel lediglich auf, daß fast alle Stadien im zweiten Versuch (mit sechs Tage alten Oocysten) jeweils etwa ein bis sechs Stunden früher auftraten. Weiterhin fiel auf, daß die Gesamtsporulation im ersten Versuch bei den Oocystensuspensionen aus der Leberverreibung, aus der Leberausspülung und aus der Gallenblasenausspülung wesentlich besser war als im zweiten Versuch, während die Oocystensuspension aus der Darmausspülung im zweiten Versuch etwa doppelt so gut sporulierte wie im ersten Versuch.

Die Messungen des Sauerstoffverbrauches der sporulierenden Oocysten in den beiden Versuchen ergab einen Gesamtsauerstoffverbrauch von ca. 30 - 40 μ l bei den Oocysten aus der Leberverreibung und Leberausspülung bzw. ca. 20 - 30 μ l bei denen aus der Gallenblasenausspülung und der Darmauswaschung pro 100.000 eingegebene Oocysten (entspricht 40 - 50 μ l bzw. 30 - 40 μ l/10⁵ sporulationsfähige

Oocysten) in 72 Stunden. Eine genaue Angabe dieses Gesamtsauerstoffverbrauchs sowie seines Verlaufes während der Sporulation ist wegen der erhöhten Fehlermöglichkeit infolge der öfteren Belüftung (s. S. 12) und der stündlichen Ablesung nicht sinnvoll. Die Werte wurden daher im Folgenden nicht weiter berücksichtigt.

Tabelle 4

Ergebnisse der Verlaufskontrolle der Sporulation einen Tag alter Oocysten von E. stiedaei verschiedenen Herkünfte: Angabe in Prozentsatz der verschiedenen Stadien nach Auszählung von je 300 Oocysten (% der "tauben" Oocysten = 100 - Summe der angegebenen Prozente).

Zeit nach Vers.- beginn	runde Sporonten		kantige Sporonten ohne Zellgrenze		4 deutliche Zellen in Pyramidenform		4 abgerundete Sporoblasten		ovale Sporocysten		voll ausgebildetes Sporozoitenstadium					
	GB*	LA	LV	DA	GB	LA	LV	DA	GB	LA	LV	DA	GB	LA	LV	DA
0 h	89,7	78,0	71,0	68,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11 h	95,0	93,6	88,7	82,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12 h	87,7	86,3	87,7	79,7	7,3	4,3	1,0	2,3	0	0	0	0	0	0	0	0
14 h	70,7	59,3	81,3	79,7	19,0	12,0	10,3	0,3	5,3	19,7	1,7	2,0	0	0	0	0
16 h	55,3	25,3	55,0	79,0	13,3	30,0	15,0	0,3	7,3	14,7	6,0	2,0	15,7	22,7	10,3	1,3
18 h	40,3	26,0	47,0	79,7	12,0	16,0	16,0	0,3	13,3	4,0	7,0	0,0	24,0	46,7	18,0	1,3
23 h	13,7	6,3	12,0	64,7	8,3	0,3	7,3	8,0	44,0	20,0	25,0	2,3	19,0	8,7	14,7	1,3
32 h	7,7	3,3	5,7	56,3	4,0	7,0	0,0	3,3	7,3	4,3	13,3	3,3	9,7	7,7	4,3	1,3
48 h	7,3	2,3	6,0	51,6	0,0	0,3	0,3	0,6	1,0	0,0	0,3	0,6	2,0	7,3	7,5	1,0
72 h	8,7	3,0	5,7	50,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Sauerstoffverbrauch in $\mu\text{l}/10^5$ eingegebene Oocysten in 72 Stunden
 Sauerstoffverbrauch in $\mu\text{l}/10^5$ sporulationsfähige Oocysten in 72 Stunden

27,5 41,6 30,0 21,7
 28,1 43,8 33,6 30,3

*) GB = Gallenblasenausspflung, LA = Leberausspflung
 LV = Leberverreibung, DA = Darmausspflung

Tabelle 5

Ergebnisse der Verlaufskontrolle der Sporulation sechs Tage alter *E. stiedai* - Oocysten verschiedener Herkunft: Angabe in Prozentsatz der verschiedenen Stadien nach Auszählung von je 300 Oocysten (% der "tauben" Oocysten = 100 - Summe der angegebenen Prozente).

Zeit nach Vers.-beginn	runde Sporonten				kantige Sporonten ohne Zellgrenze				4 deutliche Zellen in Pyramidenform				4 abgerundete Sporoblasten				ovale Sporocysten				voll ausgebildetes Sporozystenstadium			
	GB ^{*)}	LA	LV	DA	GB	LA	LV	DA	GB	LA	LV	DA	GB	LA	LV	DA	GB	LA	LV	DA	GB	LA	LV	DA
11 h	87,3	88,0	84,3	86,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13 h	82,0	82,3	63,3	85,3	2,3	5,0	0,7	0,0	0	0,3	0	0	0	0	0,7	0	0	1,0	0	0	0	0	0	0
17 h	77,7	54,3	54,3	84,0	2,3	11,0	10,3	1,7	3,7	15,0	5,3	1,3	0	3,7	7,3	3,0	0	1,3	1,0	0	0	0	0	0
19 h	71,0	50,3	43,0	79,3	5,0	6,3	8,0	4,3	5,3	13,0	10,3	1,7	0	5,0	11,3	11,0	0	3,3	7,7	3,0	0	0	0	0
21 h	45,3	27,0	24,0	69,3	5,0	8,7	4,7	2,3	12,7	9,7	8,0	1,7	0	6,7	14,7	13,7	3,3	16,3	25,0	17,3	4,0	0	0	0
25 h	45,0	29,0	16,0	63,3	3,7	4,7	2,3	7,0	8,7	11,0	4,7	1,0	0	7,7	5,7	10,0	8,7	16,7	33,7	31,3	3,7	2,0	3,0	0,6
47 h	40,0	19,0	15,0	35,3	1,3	0,3	0,6	1,6	1,3	0,0	0,3	2,3	0	0,3	0,6	1,3	5,3	5,0	9,6	8,3	21,3	40,0	64,4	42,3
72 h	31,0	11,3	8,3	28,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	54,0	75,0	58,0	57,0	54,0	75,0	58,0

Sauerstoffverbrauch in $\mu\text{l}/10^5$ eingegebene Oocysten in 72 Stunden
 Sauerstoffverbrauch in $\mu\text{l}/10^5$ sporulationsfähige Oocysten in 72 Stunden

32,6 35,2 31,7 29,5
 38,4 40,8 47,8 34,6

*) GB = Gallenblasenausspflung LA = Leberausspflung
 LV = Leberverreibung DA = Darmausspflung

2. Ergebnisse der manometrischen Hauptversuche (Tabellen 6 - 9 und Abb. 1 - 4).

Aus den Definitionen der Berechnungskriterien (s. S. 14 u. 15) geht hervor, daß der Prozentsatz der tauben Oocysten in den einzelnen Versuchen bei der Beurteilung der Versuchsergebnisse nicht außer acht gelassen werden darf. In der ersten Versuchsreihe war er mit etwa 2 % bei den Oocysten der Darmauswaschung bis maximal 10 % bei jenen aus der Leberverreibung und aus der Gallenblasenausspülung relativ niedrig. In der zweiten Versuchsreihe betrug er 4 - 5 % bei den Oocysten der Darmauswaschung und aus der Gallenblase, lag jedoch mit 22 bzw. 30 % bei den Oocysten aus der Leberausspülung und aus der Leberverreibung wesentlich höher. Im Verlauf der Sporulation veränderten sich diese Prozentsätze nicht wesentlich, wenn auch, wie oben bereits beschrieben, taube Oocysten zu sporulationsfähigen nachträglich reifen konnten, dagegen sporulationsfähige durch Degeneration bei späteren Auszählungen zu den tauben zu rechnen waren.

Die Sporulation der Oocysten verlief in der ersten Versuchsreihe wesentlich uneinheitlicher als in der zweiten. Mit einer Ausnahme (Vers. I₁, LA) sporulierten alle als sporulationsfähig anzusehende Oocysten aus der Leberausspülung und aus der Darmauswaschung sehr gut, während bei denjenigen aus der Leberverreibung und aus der Gallenblasenausspülung ein relativ hoher Prozentsatz von ca. 12 - 28 % bzw. 25 - 44 % im unsporulierten Stadium 0 verblieb, was sich (unter Berücksichtigung des Prozentsatzes der tauben Oocysten) sowohl in dem niedrigen Sporulationsgrad als auch in dem stark verminderten Sporulationsindex ausdrückt.

In der zweiten Versuchsreihe war das Sporulationsergebnis bei den Oocysten aller vier Suspensionen etwa gleich gut (s. Sporulationsindex in Tabellen 6 - 9), wenn auch der Sporulationsgrad, bedingt durch den hohen Anteil der tauben Oocysten, bei den Suspensionen aus der Leberverreibung und aus der Leberausspülung gewisse Unterschiede aufweist.

Wie in den Vorversuchen wurde auch in diesen beiden Versuchsreihen gefunden, daß in der 48. Stunde nach Versuchsbeginn die Sporulation morphologisch mit der Ausbildung der Sporozoiten abgeschlossen war.

Der Gesamtsauerstoffverbrauch stieg etwa bis zur 24. Stunde nahezu gleichmäßig an (Durchschnittlicher Sauerstoffverbrauch ca. 0,7 bis 1,1 μ l/100.000 eingegebene Oocysten, s. Abb. 1 - 4). Unterschiede im Kurvenverlauf deuten sich bei den Oocystensuspensionen der verschiedenen Herkünfte zwar an, sind aber noch nicht ausgeprägt. Im allgemeinen folgt auf diesen steilen Anstieg eine Abflachung der Sauerstoffverbrauchskurven, die jedoch von kurzen, erneuten steileren Anstiegen unterbrochen werden kann. Während in den meisten Fällen die Kurven divergierend verlaufen, ist ab und zu, bedingt durch diese sekundären steileren Anstiege, ein Schneiden zweier Kurven zu beobachten, für das jedoch keine Gesetzmäßigkeit zu gelten scheint, außer der, daß es sich in der Regel um zwei primär benachbarte Kurven handelt. Der spätere Verlauf der Kurven zwischen der 72. und 96. Stunde ist annähernd parallel. Ein ausgesprochen verminderter Sauerstoffverbrauch während der Sporulation konnte nur in Einzelfällen in Form sogenannter "Plateaus" festgestellt werden. Diese lagen bei allen Versuchen, in denen sie auftraten, zwischen der 24. und 48. Stunde.

Die im Anschluß an die Sauerstoffmessungen durchgeführten bakteriologischen Untersuchungen ⁺⁾ ergaben, daß bei den insgesamt 240 Einzeluntersuchungen in den geprüften Oocystensuspensionen einundzwanzigmal ein mittelgradiger Keimgehalt nachgewiesen werden konnte. Auf Grund der Unregelmäßigkeit des Vorkommens des Keimfalls (nie gleichzeitig in allen drei Parallelproben), der festgestellten bakteriziden Wirkung des Kaliumbichromats und der Versuchsergebnisse kann jedoch angenommen werden, daß es sich erstens höchstwahrscheinlich um eine sekundäre Verunreinigung der Oocystensuspensionen nach Abschluß der Versuche handelte, und zweitens,

⁺⁾ Die bakteriologischen Untersuchungen wurden vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere in Giessen durchgeführt.

falls trotzdem noch mit einer Verunreinigung der Oocystensuspensionen während des Versuches zu rechnen ist, diese keinen Einfluß auf das Versuchsergebnis gehabt haben kann. Deshalb wurden die Ergebnisse dieser Gefäße hinsichtlich des Sauerstoffverbrauches der Coccidienoocysten in den nachfolgenden Berechnungen mitverwertet.

In den Tabellen 6 - 9 ist der Sauerstoffverbrauch der sporulierenden Oocysten berechnet worden auf die drei verschiedenen Kriterien: je 100.000 eingegebene, sporulationsfähige und sporulierte Oocysten.

Für alle weiteren Berechnungen und Vergleiche wurden die auf "sporulationsfähige Oocysten" bezogenen Werte zugrundegelegt.

3. Beziehungen zwischen dem Sporulationsverlauf und dem Sauerstoffverbrauch der E. stiedai-Oocysten (Abb. 3 u. 4).

Der Sporulationsindex der Coccidienoocysten zeigte in den ersten 48 Stunden einen steilen Anstieg. Von dieser Zeit an war eine starke Abflachung der Indexkurve bzw. nur eine geringe Zunahme des Sporulationsindex zu verzeichnen. Eine Korrelation zwischen dem Kurvenverlauf beider Werte läßt sich nicht feststellen, wenn man von den steilen Anfangsteilen beider Kurven absieht. Die Indexkurve gleicht einer Kurve, die sich im wesentlichen aus zwei Geraden zusammensetzt, deren Schnittpunkt meist etwa bei der 48. Stunde liegt, während die Sauerstoffverbrauchskurve eher einer Hyperbel ähnelt, deren Steigung sich schließlich einem sehr geringen, nahezu konstanten Wert zu nähern scheint. Eine dem Knick der Indexkurve entsprechende deutliche Änderung des Kurvenverlaufes des Sauerstoffverbrauches konnte nie beobachtet werden.

4. Ergebnisse der statistischen Auswertung der beiden manometrischen Hauptversuche (I und II), (Tabelle 10 bis 15).

Bei einer Zusammenstellung der Ergebnisse des Gesamtsauerstoffverbrauches nach einer Sporulationsdauer von 72 Stunden, bezogen auf 100.000 sporulationsfähige Oocysten, fällt auf, daß eine ge-

Tabelle 6

Sauerstoffverbrauch und Sporulationsdaten sporulierender E.stiedai-Oocysten aus der Leberausrückung (LA) und Leberverreibung (LV) in der ersten Hauptversuchsreihe nach 0 - 5 Wochen Aufbewahrung und einer Sporulationszeit von 72 Stunden (Definitionen s.S.14 und 15) +)

Herkunft der Oocysten		Versuchs Nr.	Auszählung von 300 Oocysten bei Versuchsende										Sauerstoffverbrauch in µl/100.000 Oocysten				
			* tauber Oocysten	* sporulationsfähiger Oocysten	* sporulierter Oocysten	Sporulations-Index-Schema					Index-Zahl	eingegeben	sporulationsfähig	sporuliert			
						Summe 0 - 4 = 100											
			0	1	2	3	4										
LA	I 1	8,3	91,7	44,7	51,2	6,9	7,3	5,1	29,5	155	41,2	44,9	92,1				
	I 2	4,6	95,4	92,7	2,8	0,8	0	0	96,4	386	40,3	42,2	43,5				
	I 3	3,7	96,3	92,0	4,5	1	0	0	94,5	379	43,8	45,5	47,6				
LV	I 1	14,0	86,0	67,7	21,3	3,1	0,4	0	75,2	305	44,2	51,4	65,3				
	I 2	14,0	86,0	69,0	19,7	2,0	0	0	78,3	315	44,3	51,5	64,1				
	I 3	11,7	89,3	77,3	13,4	2,3	0	0	85,3	344	40,8	45,6	52,8				
LA	I 4	5,7	94,3	92,0	2,4	0	0	0	97,6	390	42,9	45,5	46,6				
	I 5	4,3	95,7	93,0	2,8	0	0	0	97,2	389	42,9	44,8	46,1				
	I 6	2,7	97,3	94,0	3,4	0	0	0	96,6	386	41,7	42,9	44,4				
LV	I 4	9,7	90,3	62,0	31,3	0	0	0	68,7	275	40,8	45,2	65,8				
	I 5	16,0	84,0	68,0	19,0	0	0	0	81,0	324	37,1	44,2	54,5				
	I 6	10,0	90,0	66,0	26,7	0	0	0	73,3	293	38,5	42,8	58,3				

+) Die angegebenen Werte sind Durchschnittte aus je drei Einzelbestimmungen.

Tabelle 7

Sauerstoffverbrauch und Sporulationsdaten sporulierender E. stiedai-Oocysten aus der Gallenblasenausspülung (GB) und der Darmauswaschung (DA) in der ersten Versuchsreihe nach 0 - 5 Wochen Aufbewahrung und einer Sporulationszeit von 72 Stunden (Definitionen s.S.14 und 15)+)

Auszählung von 300 Oocysten bei Versuchsende																	Sauerstoffverbrauch in µl/100.000 Oocysten		
Herkunft der Oocysten	Versuchs-Nr.	Sporulations-Index-Schema										Index-Zahl	eingeliegt			Sporulations- fähig	Sporuliert		
		Summe 0 - 4 = 100																	
		0	1	2	3	4													
GB	I 1	14,3	85,7	57,7	32,7	3,5	0	0	63,8	259	34,2	40,0	59,3						
	I 2	8,3	91,7	66,0	28,0	1,2	0	0	70,8	284	30,4	33,2	46,1						
	I 3	8,3	91,7	54,0	41,1	3,3	0	0	55,6	226	36,1	39,3	66,9						
DA	I 1	2,7	97,3	95,0	2,4	1,0	0	0	96,6	387	43,3	44,5	45,5						
	I 2	3,0	97,0	95,3	1,8	1,3	0	0	96,9	389	33,9	34,9	35,6						
	I 3	1,0	99,0	98,0	1,0	0,7	0	0	98,3	394	38,4	38,8	39,2						
GB	I 4	8,0	92,0	50,0	46,0	0	0	0	54,0	216	33,0	35,9	66,1						
	I 5	11,7	88,3	45,0	49,0	0	0	0	51,0	204	28,9	32,7	64,2						
	I 6	10,0	90,0	46,0	49,0	0	0	0	51,0	204	35,5	39,4	77,1						
DA	I 4	0,3	99,7	97,0	2,7	0	0	0	97,3	389	32,6	32,9	33,6						
	I 5	0,7	99,3	97,0	2,3	0	0	0	97,7	391	34,4	34,6	35,5						
	I 6	1,3	98,7	97,0	1,7	0	0	0	98,3	393	37,8	38,3	39,0						

+). Siehe Fußnote zu Tabelle 6.

Tabelle 8

Sauerstoffverbrauch und Sporulationsdaten sporulierender E. stiedai-Oocysten aus der Leberausspülung (IA) und Leberverreibung (LV) in der zweiten Hauptversuchsreihe nach 0 - 5 Wochen Aufbewahrung und einer Sporulationszeit von 72 Stunden (Definition s.S. 14 und 15)¹⁾

Auszählung von 300 Oocysten bei Versuchsende										Sauerstoffverbrauch in $\mu\text{l}/100.000$ Oocysten			
Herkunft der Oocysten	Versuchs-Nr.	* tauber Oocysten	* sporulations- fähiger Oocysten	* sporulierter Oocysten	Sporulations-Index-Schema Summe 0 - 4 = 100					Index-Zahl	eingegeben	sporulations- fähig	sporuliert
					0 1 2 3 4								
					0	1	2	3	4				
IA	II 1	24,0	76,0	73,7	3,0	0	0	0	97,0	388	46,8	61,6	63,5
	II 2	21,0	79,0	76,0	3,8	0,9	0	0	95,3	382	49,4	62,5	65,0
	II 3	25,0	75,0	71,0	5,3	0,4	0	0	94,3	378	46,8	62,4	65,9
LV	II 1	31,0	69,0	68,0	1,5	0	0	0	98,5	394	38,2	55,4	56,2
	II 2	26,0	74,0	71,7	3,1	1,0	0	0	95,9	385	42,6	57,6	59,4
	II 3	28,3	71,7	69,0	3,8	2,0	0	0	93,9	378	37,9	52,9	55,0
IA	II 4	26,4	73,6	71,3	3,0	0,5	0,5	0	96,0	386	43,4	59,0	60,8
	II 5	23,4	76,6	73,3	4,3	0	0	0	95,7	383	37,6	49,1	51,3
	II 6	23,0	77,0	74,0	4,0	0	0	0	96,0	384	39,6	51,4	53,4
LV	II 4	29,0	71,0	67,7	4,6	0,5	0,5	0	94,4	379	35,4	49,9	52,2
	II 5	28,0	72,0	70,0	2,8	0	0	0	97,2	389	32,2	44,7	46,0
	II 6	31,7	68,3	63,3	7,3	0,5	0	0	92,2	369	39,7	58,1	62,7

¹⁾ Siehe Fußnote zu Tabelle 6.

Tabelle 9

Sauerstoffverbrauch und Sporulationsdaten sporulierender E.stiedai-Oocysten aus der Gallenblasenauspüfung (GB) und der Darmauswaschung (DA) in der zweiten Hauptversuchsreihe nach 0 - 5 Wochen Aufbewahrung und einer Sporulationszeit von 72 Stunden (Definitionen s. 14 und 15)^{*)}

Auszählung von 300 Oocysten bei Versuchsende											Sauerstoffverbrauch in $\mu\text{l}/100.000$ Oocysten					
Herkunft der Oocysten	Versuchs-Nr.	%	tauber Oocysten	%	sporulations- fähiger Oocysten	%	sporulierter Oocysten	Sporulations-Index-Schema					Index-Zahl	eingabe- n	sporulations- fähig	sporuliert
								Summe 0 - 4 = 100								
								0	1	2	3	4				
GB	II 1	6,0	94,0	88,3	6,0	0	0	0	94,0	376	49,3	52,4	55,8			
	II 2	7,0	93,0	86,3	7,2	0,3	0	0	92,5	370	45,1	48,5	52,3			
	II 3	4,0	96,0	87,0	9,4	1,0	0	0	89,6	359	46,0	47,9	52,8			
DA	II 1	2,0	98,0	94,0	4,1	0	0	0	95,9	384	46,0	47,9	49,0			
	II 2	3,3	96,7	92,3	4,6	0	0	0	95,4	382	46,7	48,3	50,6			
	II 3	4,0	96,0	90,3	5,9	0	0	0	94,1	376	44,6	46,5	49,4			
GB	II 4	4,0	96,0	91,7	4,5	0	0	0	95,5	382	40,4	42,1	44,0			
	II 5	3,4	96,6	90,3	6,5	0	0	0	93,5	374	36,4	38,9	40,3			
	II 6	3,7	96,3	92,7	3,7	0	0	0	96,3	385	35,2	36,6	38,0			
DA	II 4	2,3	97,7	93,7	4,1	1,0	0	0	94,9	381	43,7	44,7	46,6			
	II 5	2,4	97,7	95,3	2,4	0,3	0	0	97,3	390	42,9	43,9	45,1			
	II 6	2,3	97,7	96,3	1,4	0,3	0	0	98,3	394	43,2	44,3	45,6			

*) Siehe Fußnote zu Tabelle 6.

Abb. 1 = Vers. I₂

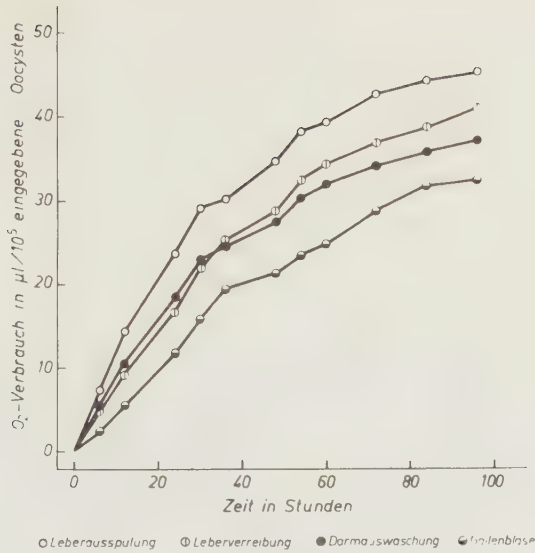
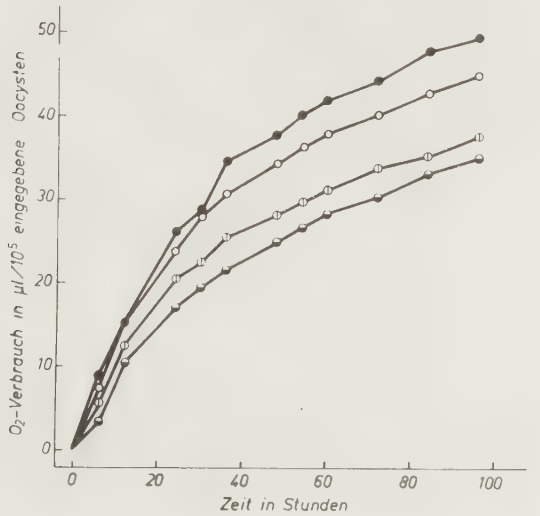


Abb. 2 = Vers. I₃



Abbildungen 1 und 2: Sauerstoffverbrauch sporulierender *E. stiedai*-Oocysten aus vier verschiedenen Isolierungsmethoden (Leberausspülung, Leberverreibung, Gallenblasenausspülung und Darmauswaschung).

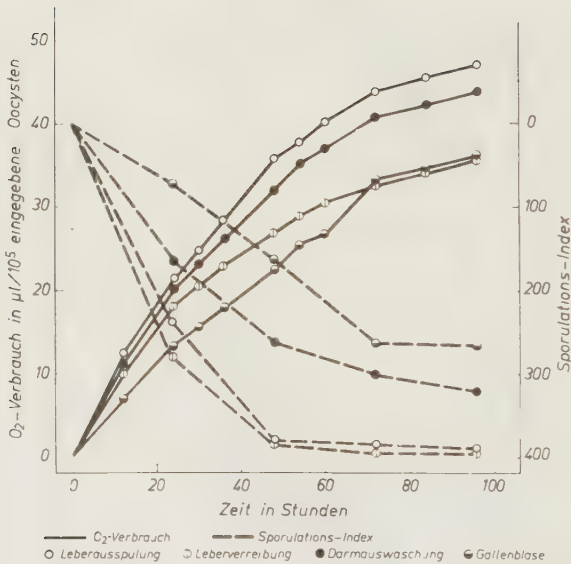


Abbildung 3: Verhältnis des Sporulations-indexes zum Sauerstoffverbrauch sporulierenden *E. stiedai*-Oocysten aus vier verschiedenen Isolierungsmethoden (Leberausspülung, Leberverreibung, Darmauswaschung und Gallenblasenausspülung), Vers. I₄

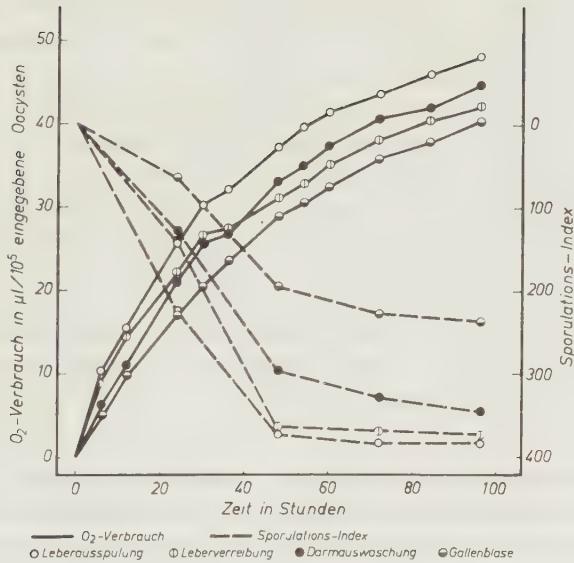


Abbildung 4: Verhältnis des Sporulationsindex zum Sauerstoffverbrauch sporulierenden *E. stiedai*-Oocysten aus vier verschiedenen Isolierungsmethoden (Leberausspülung, Leberverreibung, Darmauswaschung und Gallenblasenausspülung), Vers. I₅

wisse Abnahme des Sauerstoffverbrauches im Laufe der Zeit, ebenso wie Differenzen des Verbrauchs zwischen den Oocysten aus den verschiedenen Isolierungsmethoden zu verzeichnen sind (Tabelle 10). Deutlichere Unterschiede scheinen zu bestehen, wenn die Ergebnisse in Gruppen zusammengefaßt werden, die einmal jeweils drei aufeinanderfolgende Versuche (I_{1-3} bzw. II_{1-3} und I_{4-6} bzw. II_{4-6}), zum anderen nach diesen Zeitgruppen geordnet, die Oocysten aus der Leberverreibung (LV) und der Leberausspülung (LA) bzw. aus der Gallenblasenausspülung (GB) und Darmauswaschung (DA) umfassen. Mit Ausnahme der Oocysten aus der Leberausspülung der ersten Versuchsreihe (I_{1-3} LA : I_{4-6} LA) sind alle Mittelwerte des Sauerstoffverbrauches beider Versuchsreihe vom 18. - 30. Tag niedriger als die der gleichen Herkunft vom 1. - 12. Tag. Bei einer Anordnung der Herkunftsgruppen innerhalb der Zeituntergruppen nach der Höhe des Sauerstoffverbrauches ergibt sich folgendes Bild:

	<u>I. Versuchsreihe</u>	<u>II. Versuchsreihe</u>
1. Zeitgruppe (I, II_{1-3})	LV > LA > DA > GB	LA > LV > GB > DA
2. Zeitgruppe (I, II_{4-6})	LA > LV > GB > DA	LA > LV > DA > GB

Ausnahmslos verbrauchten demnach in jedem Fall die Oocysten der Gruppenkombination Leberausspülung und Leberverreibung zusammengekommen mehr Sauerstoff als die Oocysten der Gruppenkombination Gallenblasenausspülung und Darmauswaschung.

Ein Vergleich der Sauerstoffverbrauchswerte für sporulierende Oocysten der beiden Versuchsreihen zeigt, daß alle Verbrauchswerte für Oocysten aus der gleichen Isolierungsmethode in der zweiten Versuchsreihe stets über denen der ersten Versuchsreihe lagen.

Die Ergebnisse der Varianzanalyse, denen die Einzelwerte aller Versuche zugrunde liegen, mit jeweils diesen Gruppen und Gruppenkombinationen innerhalb einer Versuchsreihe zeigen, daß in Bezug auf den Sauerstoffverbrauch sowohl zwischen den Oocysten der gegeneinander geprüften Gruppen und Gruppenkombinationen als auch zwischen den beiden Zeitgruppen signifikante Unterschiede bestehen. Beide Faktoren, Herkunft und Zeit, wirken jedoch unabhängig voneinander (Tabellen 11 und 12).

Um Einzelheiten über die Lage der Signifikanzen zwischen den verschiedenen Gruppen zu erfahren, wurden im Anschluß an die Varianzanalyse die einzelnen Ergebnisse mit dem t-Test nach STUDENT miteinander verglichen.

Es zeigte sich dabei, daß sich in der ersten Versuchsreihe in der ersten Zeitgruppe (Vers. I₁₋₃) der Sauerstoffverbrauch der Oocysten aller Gruppen bzw. Gruppenkombinationen signifikant voneinander unterscheidet. In der zweiten Zeitgruppe der gleichen Versuchsreihe (Vers. I₄₋₆) bestehen keine signifikanten Differenzen zwischen dem Sauerstoffverbrauch der Oocysten aus der Leberverreibung und der Leberausspülung bzw. zwischen denjenigen aus der Gallenblasenausspülung und der Darmauswaschung, während die Unterschiede in allen übrigen Fällen als gesichert angesehen werden können (Tabellen 13 A und 14 A).

In der analog geprüften zweiten Versuchsreihe besteht lediglich zwischen den Sauerstoffverbrauchswerten der Oocysten aus der Leberverreibung und der Leberausspülung in der zweiten Zeitgruppe (Vers. II₄₋₆ LV : LA) keine signifikante Differenz (Tabellen 13 B und 14 B).

Bei der Suche nach der Lage der in der Varianzanalyse angezeigten signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zeitgruppen (I, II₁₋₃ : I, II₄₋₆) bei Oocysten der gleichen Herkunft (s. Tabelle 15) ergab sich, daß in der ersten Versuchsreihe nur zwischen den Oocysten aus der Leberverreibung, in der zweiten Versuchsreihe dagegen zwischen den Oocysten aus der Leberausspülung, Gallenblasenausspülung und der Darmauswaschung signifikante Unterschiede bestehen.

Bei demselben Vergleich zwischen den beiden Zeitgruppen der Gruppenkombination Leberverreibung und Leberausspülung (LV + LA) war der Unterschied im Sauerstoffverbrauch nur in der zweiten Versuchsreihe (II₁₋₃ : II₄₋₆) signifikant, während bei der Gruppenkombination Gallenblasenausspülung und Darmauswaschung (GB + DA) in beiden Versuchsreihen signifikante Unterschiede zu finden waren.

Bei einem Vergleich aller Sauerstoffverbrauchswerte von Oocysten aus der gleichen Isolierungsmethode zwischen der ersten und zweiten Versuchsreihe (I₁₋₆ : II₁₋₆) mit Hilfe des t-Testes konnte die Signifikanz der Unterschiede in jedem Fall gesichert werden (Tabelle 16).

Tabelle 10

Einzel- und Durchschnittswerte des Sauerstoffverbrauches der E. stiedai-Oocysten nach einer Sporulationszeit von 72 Stunden, bezogen auf 100.000 sporulationsfähige Oocysten.

Vers. Nr.	Herkunft ¹⁾ der Ooc.	Erste Versuchsreihe				Vers. Nr.	Zweite Versuchsreihe			
		LA	LV	GB	DA		LA	LV	GB	DA
I ₁		43,5	49,0	40,1	43,8	II ₁	61,1	54,1	54,5	47,8
		42,3	54,3	42,8	42,4		57,6	59,0	51,8	47,9
$\bar{x}$		48,9	50,9	36,6	46,8		66,2	53,1	51,0	48,2
				40,0				61,6	55,4	52,4
					44,5					48,0
I ₂		39,6	53,1	31,5	35,2	II ₂	60,3	57,8	51,5	48,5
		40,7	49,0	33,6	33,5		60,3	59,9	50,2	48,5
		46,2	52,2	34,4	36,2		67,2	55,1	44,9	49,0
$\bar{x}$				33,2				62,5	57,6	48,5
			51,5		34,9					48,3
I ₃		44,7	44,6	42,0	36,8	II ₃	61,9	53,3	48,7	45,6
		43,4	46,0	36,6	37,7		60,0	54,4	46,4	45,6
		48,6	46,6	39,5	41,9		65,3	51,1	48,5	48,2
$\bar{x}$				39,3				62,4	52,9	47,9
			45,6		38,8					46,5
I ₄		45,5	42,9	38,5	32,6	II ₄	56,0	53,8	42,9	43,8
		44,4	50,2	34,6	31,8		54,2	49,9	40,8	43,8
		46,5	42,4	34,2	33,6		63,7	45,4	42,4	46,3
$\bar{x}$				35,9				59,0	49,9	42,1
			45,2		32,9					44,7
I ₅		44,8	48,8	35,3	33,5	II ₅	49,6	44,7	40,9	41,1
		41,7	38,0	32,6	31,9		49,5	45,0	36,8	41,0
		47,9	46,8	31,0	38,6		45,7	43,1	35,4	47,4
$\bar{x}$				32,7				49,1	38,9	43,9
			44,2		34,6					
I ₆		42,6	44,0	41,7	36,9	II ₆	48,6	60,0	38,1	41,5
		44,6	41,7	38,6	39,4		51,8	59,6	38,6	44,8
		41,4	42,6	38,2	38,8		53,8	54,8	34,9	48,5
$\bar{x}$				39,4				51,4	58,1	36,6
			42,8		38,3					44,2

¹⁾ LA = Leberausspülung, LV = Leberverreibung, GB = Gallenblasenausspülung, DA = Darmauswaschung.

Tabelle 11

Vergleich des Sauerstoffverbrauches sporulierender E. stiedai-Oocysten verschiedener Herkünfte (Leberausspülung, Leberverreibung, Gallenblasenausspülung und Darmauswaschung) und nach unterschiedlicher Aufbewahrungsdauer (1-12 Tage und 18-30 Tage) mittels Varianzanalyse.

A. Erste Versuchsreihe

VARIABILITÄT	SQ	FG	MQ	F-Wert	F-Grenze ($\alpha = 0,005$)
HERKUNFT	1371,6	3	457,2	41,1	4,8
ZEIT	129,1	1	129,1	11,6	8,6
ZEIT $\times$ HERKUNFT	86,1	3	28,7	2,6	4,8

B. Zweite Versuchsreihe

VARIABILITÄT	SQ	FG	MQ	F-Wert	F-Grenze ($\alpha = 0,005$)
HERKUNFT	2014,3	3	671,5	44,9	4,8
ZEIT	906,0	1	906,0	60,6	8,6
ZEIT $\times$ HERKUNFT	180,4	3	60,1	4,0	4,8

Tabelle 12

Vergleich des Sauerstoffverbrauches sporulierender E. stiedai-Oocysten der beiden Herkunftsgruppen (Leberausspülung + Leberverreibung, Gallenblasenausspülung + Darmauswaschung) und nach unterschiedlicher Aufbewahrungsdauer (1-12 Tage und 18-30 Tage) mittels Varianzanalyse.

A. Erste Versuchsreihe

VARIABILITÄT	SQ	FG	MQ	F-Wert	F-Grenze ($\alpha = 0,005$)
HERKUNFT	1310,7	1	1310,7	102,7	8,6
ZEIT	129,1	1	129,1	10,1	8,6
ZEIT HERKUNFT	0,1	1	0,1	0,0	8,6

B. Zweite Versuchsreihe

VARIABILITÄT	SQ	FG	MQ	F-Wert	F-Grenze ($\alpha = 0,005$)
HERKUNFT	1820,1	1	1820,1	88,9	8,6
ZEIT	906,0	1	906,0	44,3	8,6
ZEIT HERKUNFT	0,0	1	0,0	0,0	8,6

Tabelle 13

Ergebnisse des t-Testes zum Vergleich des Sauerstoffverbrauches ($\mu\text{l O}_2/10^5$ Oocysten) sporulierender E. stiedai-Oocysten der verschiedenen Herkunft (Leberausspülung (LA), Leberverreibung (LV), Gallenblasenausspülung (GB) und Darmauswaschung (DA)) innerhalb der Zeitgruppen (1-12 und 18-30 Tage Aufbewahrungsdauer).

A. Erste Versuchsreihe (1-12 Tag)

LA	LV	P	GB	P	DA	P
44,2 $\pm$ 2,5	49,5 $\pm$ 2,6	P<0,01	37,5 $\pm$ 3,0	P<0,01	39,4 $\pm$ 3,5	P<0,01
	49,5 $\pm$ 2,6	:	37,5 $\pm$ 3,0	P<0,01	39,4 $\pm$ 3,5	P<0,01
			37,5 $\pm$ 3,0	:	39,4 $\pm$ 3,5	P<0,05

18 - 30 Tag

LA	LV	P	GB	P	DA	P
44,4 $\pm$ 1,7	44,2 $\pm$ 2,9	P>0,05	36,1 $\pm$ 2,6	P<0,01	35,2 $\pm$ 2,4	P<0,01
	44,2 $\pm$ 2,9	:	36,1 $\pm$ 2,6	P<0,01	35,2 $\pm$ 2,4	P<0,01
			36,1 $\pm$ 2,6	:	35,2 $\pm$ 2,4	P>0,05

B. Zweite Versuchsreihe (1-12 Tag)

LA	LV	P	GB	P	DA	P
62,2 $\pm$ 2,5	55,3 $\pm$ 2,3	P<0,01	49,7 $\pm$ 2,3	P<0,01	47,6 $\pm$ 0,0	P<0,01
	55,3 $\pm$ 2,3	:	49,7 $\pm$ 2,3	P<0,01	47,6 $\pm$ 0,0	P<0,01
			49,7 $\pm$ 2,3	:	47,6 $\pm$ 0,0	P<0,05

Tabelle 13 B (Fortsetzung)

18 - 30 Tag

LA	LV	P	GB	P	DA	P
52,5 ± 4,0	50,7 ± 5,0	P>0,05	39,0 ± 2,3	P<0,01	44,2 ± 2,1	P<0,01
	50,7 ± 5,0	:	39,0 ± 2,3	P<0,01	44,2 ± 2,1	P<0,01
			39,0 ± 2,3	:	44,2 ± 2,1	P<0,01

Tabelle 14

Ergebnisse des t-Testes zum Vergleich des Sauerstoffverbrauches sporulierender E. stiedai-Oocysten der Herkunftsgruppen (LA + LV und GB + DA) und der Zeitgruppen (1-12 und 18-30 Tage Aufbewahrungsdauer).

A. Erste Versuchsreihe

LA+LV ₁₋₃	LA+LV ₄₋₆	P	GB+DA ₁₋₃	P	GB+DA ₄₋₆	P
46,9 ± 2,1	44,8 ± 1,3	P>0,05	38,4 ± 2,1	P<0,01		
	44,8 ± 1,3	:			35,7 ± 1,6	P<0,01
			38,4 ± 2,1	:	35,7 ± 1,6	P<0,05

B. Zweite Versuchsreihe

LA+LV ₁₋₃	LA+LV ₄₋₆	P	GB+DA ₁₋₃	P	GB+DA ₄₋₆	P
58,8 ± 2,3	51,6 ± 3,0	P<0,01	48,7 ± 1,2	P<0,01		
	51,6 ± 3,0	:			41,6 ± 1,9	P<0,01
			48,7 ± 1,2	:	41,6 ± 1,9	P<0,01

Tabelle 15

Vergleich des Sauerstoffverbrauches der Oocysten gleicher Herkunft mit verschiedenen Aufbewahrungszeiten (1-12 Tage und 18-30 Tage Aufbewahrungsdauer) mittels Varianzanalyse.

A. Erste Versuchsreihe

		SQ	FG	MQ	F - Wert	F-Grenze ($\alpha=0,005$)
LA ⁺⁾	1-3 : 4-6	0,1	1	0,1	0,0	8,6
LV	1-3 : 4-6	129,6	1	129,6	29,4	8,6
GB	1-3 : 4-6	8,5	1	8,5	1,5	8,6
DA	1-3 : 4-6	76,9	1	76,9	4,4	8,6

B. Zweite Versuchsreihe

LA	1-3 : 4-6	420,5	1	420,5	24,7	8,6
LV	1-3 : 4-6	95,7	1	95,7	2,7	8,6
GB	1-3 : 4-6	519,5	1	519,5	269,3	8,6
DA	1-3 : 4-6	60,1	1	60,1	15,2	8,6

+) LA = Leberausspülung LV = Leberverreibung
 GB = Gallenblasenausspülung DA = Darmauswaschung

Tabelle 16

Ergebnisse des t-Testes zum Vergleich des Sauerstoffverbrauches sporulierender E. stiedai-Oocysten der beiden Hauptversuchsreihen (I : II) unter Berücksichtigung der gleichen Herkunft (Isolierungsmethode).

HERKUNFT ⁺⁾	VERSUCH I ₁₋₆	VERSUCH II ₁₋₆	N	P
LA	44,3 ± 1,3	57,4 ± 3,3	36	P<0,01
LV	46,8 ± 2,2	53,0 ± 2,7	36	P<0,01
GB	36,8 ± 1,8	44,4 ± 3,1	36	P<0,01
DA	37,3 ± 2,2	45,9 ± 1,3	36	P<0,01

⁺⁾ LA = Leberausspülung LV = Leberverreibung
GB = Gallenblasenausspülung DA = Darmauswaschung

5. Ergebnisse der Untersuchungen des Sauerstoffverbrauches der Oocysten von *E. stiedai* im Anschluß an ihre Sporulation (Tabellen 17 u. 18, Abb. 1 - 5).

Bei einer Verfolgung der Sporulation der in den vorliegenden Versuchen benutzten Oocysten bis zur 96. Stunde nach dem Sporulationsbeginn zeigte sich, daß der Sporulationsindex bis auf geringe Schwankungen, die meist noch innerhalb der Fehlerbreite der Indexbestimmung lagen, zwischen der 72. Stunde und der 96. Stunde konstant blieb. Der Sauerstoffverbrauch in diesen 24 Stunden betrug im Durchschnitt für alle Herkünfte beider Versuchsreihen $3,7\mu\text{l}/100.000$ eingegebene Oocysten (Schwankungsbreite = $2,0 - 6,0\mu\text{l}$), (Abb. 1 - 4, Tabellen 17 und 18). Eine Korrelation zwischen dem Sporulationsindex, dem Sauerstoffverbrauch und der Herkunft war für diesen Zeitabschnitt nicht feststellbar.

Während einer Versuchsdauer von 72 Stunden verbrauchten 100.000 eingegebene Oocysten von *E. stiedai* direkt im Anschluß an ihre Sporulation (72. - 144. Stunde nach Sporulationsbeginn) $8 - 12\mu\text{l}$ Sauerstoff. 100 Stunden (ca. 4 Tage) bzw. 5 Tage nach einer 72-stündigen Sporulation, also 7 bzw. 8 Tage nach Sporulationsbeginn, verbrauchte die gleiche Menge Oocysten in weiteren 72 Stunden $5 - 8\mu\text{l}$ Sauerstoff. Dagegen verbrauchten 100.000 eingegebene Oocysten ca. 90 Tage nach ihrer Sporulation nur noch etwa $2,5\mu\text{l}$ Sauerstoff in 48 Stunden. Der Sauerstoffverbrauch pro Zeiteinheit war innerhalb der jeweiligen Versuchsdauer weitgehend konstant. Die in Abbildung 5 links eingezeichneten steilen Kurven stellen zum Vergleich den Anfangsverlauf der Sauerstoffverbrauchskurven sporulierender Oocysten dar.

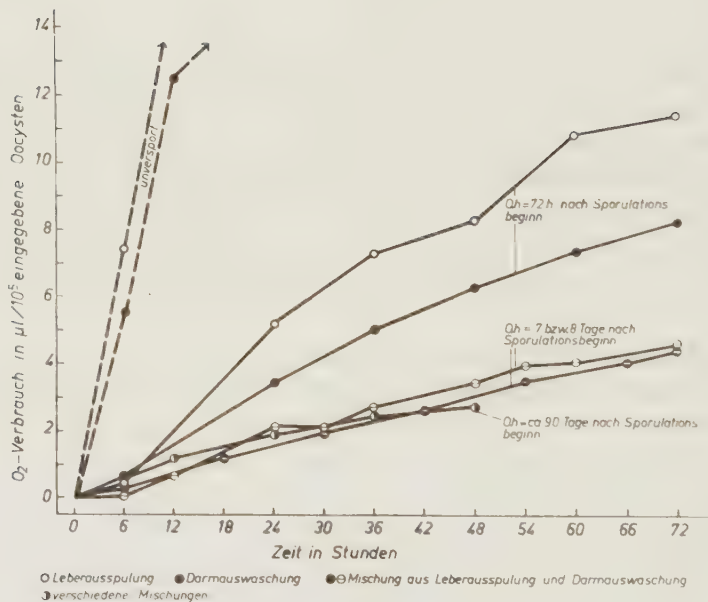


Abb. 5: Sauerstoffverbrauch sporulierender E. stiedai-Oocysten nach unterschiedlicher Aufbewahrungszeit nach der Sporulation.

Tabelle 17

Sporulationsgrad, Sporulationsindex und Sauerstoffverbrauch von E. stiedal-Oocy-
sten 72 und 96 Stunden nach Sporulationsbeginn (erste Versuchsreihe).

Vers. Nr.	Herkunft der Oocysten	72 Stunden nach Sporul.-beginn		96 Stunden nach Sporula.-beginn		O ₂ -verbrauch zw. der 72. und 96 h in μ l
		Sporul.- grad	Index	Sporul.- grad	Index	
I ₁	GB ⁺⁾	52,0	259	57,6	264	6,0
	LA	44,0	155	48,3	155	1,3
	LV	61,0	305	67,7	305	2,0
	DA	95,0	387	95,0	392	4,2
I ₂	GB	70,3	284	66,0	284	4,8
	LA	95,3	386	95,0	386	4,6
	LV	72,6	315	69,6	315	5,1
	DA	96,1	389	97,3	394	3,8
I ₃	GB	55,0	226	53,6	222	4,7
	LA	91,3	379	91,0	378	4,4
	LV	77,3	344	76,3	344	4,8
	DA	97,6	394	98,3	394	3,9
I ₄	GB	55,3	216	53,5	216	3,0
	LA	92,0	390	93,0	392	4,0
	LV	68,0	275	69,6	275	3,0
	DA	97,6	389	97,3	389	3,1
I ₅	GB	47,3	204	48,0	204	3,7
	LA	94,0	389	94,3	390	3,6
	LV	67,0	324	73,1	342	4,1
	DA	97,6	391	96,3	391	2,9
I ₆	GB	53,6	204	50,3	204	4,5
	LA	95,3	386	94,6	386	2,9
	LV	61,6	293	69,3	303	3,6
	DA	96,3	393	97,6	393	3,3

+) GB = Gallenblasenausspülung, LA = Leberausspülung, LV = Leberverreibung, DA = Darmauswaschung

Tabelle 18

Sporulationsgrad, Sporulationsindex und Sauerstoffverbrauch von E. stied-
Oocysten 72 und 96 Stunden nach Sporulationsbeginn (Zweite Versuchsreihe).

Vers. Nr.	Herkunft der Oocysten	72 Stunden nach Sporul.-beginn			96 Stunden nach Sporul.-beginn			O ₂ -verbrauch zw. der 72. u. 96 h in µl
		Sporul.- grad	Index	O ₂ -verbrauch in µl	Sporul.- grad	Index	O ₂ -verbrauch in µl	
II ₁	GB ⁺)	88,3	376	49,3	86,7	376	52,1	2,8
	LA	73,7	388	46,8	74,3	389	49,4	2,6
	LV	68,0	394	38,2	67,3	394	41,7	3,5
	DA	94,0	384	46,0	96,3	385	50,3	4,3
II ₂	GB	86,3	370	45,1	86,3	370	48,7	3,5
	LA	76,0	382	49,4	76,0	382	52,4	3,0
	LV	71,7	385	42,6	71,7	385	46,1	3,5
	DA	92,3	382	46,7	92,3	382	50,7	4,0
II ₃	GB	87,0	359	46,0	90,3	368	50,6	4,6
	LA	71,0	378	46,8	73,0	382	52,0	5,2
	LV	69,0	378	37,9	66,0	378	42,6	4,7
	DA	90,3	376	44,6	92,0	380	48,6	4,0
II ₄	GB	91,7	382	40,4	92,0	382	43,9	3,5
	LA	71,3	396	43,4	70,7	386	46,3	2,9
	LV	67,7	379	35,4	65,7	380	38,9	3,5
	DA	93,7	381	43,7	95,0	388	47,6	3,9
II ₅	GB	90,3	374	36,4	92,7	381	41,0	4,6
	LA	73,3	383	37,6	74,3	386	42,7	5,1
	LV	70,0	389	32,2	70,0	389	36,9	4,7
	DA	95,3	390	42,9	97,0	392	46,9	4,0
II ₆	GB	92,7	385	35,2	92,3	385	38,2	3,0
	LA	74,0	384	39,6	73,7	384	43,3	3,7
	LV	63,3	369	39,7	68,3	382	43,7	4,0
	DA	96,3	394	43,9	97,0	398	48,4	4,5

+) GB = Gallenblasenausspülung, LA = Leberausspülung, LV = Leberverreibung, DA = Darmausspülung.

V. Diskussion

In den Versuchen über die reinigende Wirkung von Kalilauge bei der Gewinnung von Coccidienoocysten und ihren Einfluß auf deren Sporulation stellte sich heraus, daß eine 15 Minuten dauernde Einwirkung von 20 %iger Kalilauge ausreicht, die Oocysten vom Leberdetritus zu befreien, ohne daß die Sporulationsfähigkeit dabei beeinträchtigt wird. Dieselbe Wirkung ist auch mit 5 %iger Kalilauge in 48 Stunden zu erreichen. Zur Gewinnung von Coccidienoocysten für analytische Zwecke ist diese Zeit aber zu lang, weil ein Beginn der Sporulation innerhalb dieser 48 Stunden bei Zimmertemperatur nicht zu vermeiden wäre. Obwohl die Einwirkung von 5 %iger Kalilauge über 76 Stunden zu keinen morphologisch sichtbaren Veränderungen führte, war das Sporulationsergebnis der Oocysten nach dieser Zeit nicht mehr befriedigend, während die Sporulation der Oocysten, die dieselbe Zeit in 7 %iger Kalilauge verbracht hatten, ungestört verlief. Diese schlechte Sporulation könnte auf den langen Aufenthalt der Oocysten in nicht oder nur wenig zerstörtem Leberdetritus, unter möglicherweise anaeroben Verhältnissen zurückzuführen sein.

Von WASIELEWSKI (1904) hat 2 bis 2,5 %ige Kaliumbichromatlösung als sporulationsförderndes, keimhemmendes und für die Oocysten unschädliches Suspensionsmedium verwendet. GOODRICH (1944) hat dafür auch 1 %ige Chromsäurelösung vorgeschlagen. In den eigenen Untersuchungen stellte sich heraus, daß außer Kaliumbichromat in 2 %iger Lösung auch Hostamycin® in einer Konzentration von 20 mg/ml diese Zwecke erfüllen kann. Der Keimgehalt der Oocystensuspensionen in Leitungswasser, Cialit® und Trichomycin®-Lösungen war in allen Proben erheblich. Die unterschiedliche, schlechte Sporulation in diesen drei Medien könnte mit der alleinigen oder kombinierten Einwirkung der fungiziden Präparate, der Bakterienflora und der Fäulnis des Leberdetritus erklärt werden. Für die manometrischen Untersuchungen wurde das billigere Kaliumbichromat dem Hostamycin® vorgezogen.

Sowohl CANNING und ANWAR (1968) als auch WAGENBACH und BURNS (1969) beschrieben in ihren Untersuchungen, daß die meiotische und mitoti-

sche Kernteilung der Sporonten der Coccidienoocysten abläuft, bevor deutliche Formveränderungen an ihnen zu sehen sind. Bei den schneller sporulierenden Geflügel-Coccidien treten diese Veränderungen früher auf als bei den Oocysten der Kaninchencoccidien. In den eigenen Untersuchungen wurden nur die morphologischen Veränderungen der Sporonten ausgewertet. Die Zeitspanne, nach der die ersten sichtbaren Veränderungen im Sinne einer Sporontenteilung festgestellt werden konnte, betrug in den eigenen Untersuchungen ca. 12 Stunden nach Versuchsbeginn. Diese Zeit stimmt mit den Ergebnissen von WAGENBACH und BURNS (1969) überein und fällt u. U. schon mit dem von ihnen beschriebenen letzten Stadium der Kernteilung zusammen.

Über die Zeitdauer des Auftretens der einzelnen Stadien können an Hand der eigenen Untersuchungen keine Aussagen gemacht werden, da ebenso wie bei den Untersuchungen von CHEISSIN (1935), aber im Gegensatz zu WAGENBACH und BURNS (1969), kein synchroner Ablauf der Sporulation der Oocysten beobachtet wurde. Für die vollständige Sporulation der Oocysten von E. stiedai bei Zimmertemperatur gibt PELLERDY (1965) drei Tage (= 72 Stunden) an.

WAGENBACH und BURNS (1969) stellten fest, daß die Sporocystenreife in der 26. Stunde beginnt, gaben aber nicht an, wann die Reife abgeschlossen ist. In den eigenen Versuchen wurden die ersten als reif zu bezeichnenden Sporocysten mit deutlich sichtbaren Sporozoiten in der 25. bis 30. Stunde gesehen. In der 48. Stunde hatten nahezu alle in Sporulation befindlichen Oocysten dieses Stadium erreicht; bis zur 72. Stunde traten bei der Differenzierung der Sporulationsstadien nur noch geringe prozentuale Verschiebungen ein.

Die schnellere Sporulation in den eigenen Untersuchungen könnte auf die höhere Temperatur, wie bei PELLERDY (1965) angegeben, und auf die in Folge des Schüttelns optimale Sauerstoffsättigung des Suspensionsmediums zurückgeführt werden.

Bei Sauerstoffverbrauchsmessungen sporulierender Oocysten ist die Bezugseinheit eine der wesentlichsten Fragen. Bisher haben nur

DÜRR und PELLERDY (1969) eine derartige Angabe gemacht, indem sie ihre Werte auf "sporulationsfähige Oocysten" bezogen, ohne allerdings diesen Begriff eindeutig zu erläutern. Bei den eigenen Untersuchungen stellte sich heraus, daß insbesondere in Abhängigkeit von der Herkunft des Materials zumindest zwischen den Gruppen "taube", "nicht sporulierte" und "sporulierte" Oocysten unterschieden werden muß, was zu den Bezugseinheiten "eingegebene Oocysten" (taube + nicht sporulierte + sporulierte Oocysten), "sporulationsfähige Oocysten" (nicht sporulierte + sporulierte Oocysten) und "sporulierte Oocysten" führt. Da der Anteil der tauben Oocysten in den verschiedenen Oocystensuspensionen stark schwankte und angenommen wurde, daß diese tauben Oocysten in ihrer Mehrzahl tote Gebilde ohne oder mit nur minimalem Sauerstoffverbrauch sind, da sich ihr Prozentsatz während des Sporulationsverlaufes nicht nennenswert änderte, wurde bei der Berechnung ihr Anteil durch Benutzung des Begriffes "sporulationsfähige Oocysten" eliminiert. Das Kriterium "sporulierte Oocysten" wurde nicht benutzt, weil der Sporulationsindex in vielen Fällen stark schwankte, jedoch nicht angenommen werden kann, daß die am Ende eines Versuches noch vorhandenen nicht sporulierten Oocysten nicht am Sauerstoffverbrauch beteiligt waren. Der 72-Stundenwert wurde verwendet, weil nach dieser Zeit keine wesentliche Veränderung des Sporulationsindex mehr auftrat. Zudem verliefen die Sauerstoffverbrauchskurven von dieser Zeit ab ohne starke Zunahme bei den Oocysten aus den verschiedenen Isolierungsmethoden annähernd parallel. Damit war gewährleistet, daß dieser Wert ein Bild von den tatsächlichen Relationen gibt.

Über den Sauerstoffverbrauch von E. stiedai während und nach der Sporulation wurde bisher nur wenig bekannt. DÜRR und PELLERDY (1969) geben an, daß 100.000 sporulationsfähige Oocysten von E. stiedai aus der Gallenblase im Verlauf einer 72 Stunden dauernden Sporulation einen Verbrauch von 30 - 39 μ l Sauerstoff haben. Für 100.000 E. stiedai-Oocysten, die aus der Leber gewonnen wurden, konnte aus den Kurven von WAGENBACH und BURNS (1969) überschlägig ein Sauerstoffverbrauch von ca. 34 μ l in 48 Stunden berechnet werden. Bei einer Extrapolation der Kurven bis zur 72. Stunde er-

gibt sich ein Sauerstoffverbrauch von ca. 46 μ l.

Die eigenen Untersuchungen mit Oocysten aus der Gallenblase ergeben Sauerstoffverbrauchswerte, die sich in den meisten Fällen mit den von DÜRR und PELLERDY (1969) angegebenen Werten decken, während der Wert von WAGENBACH und BURNS (1969) ein guter Mittelwert aller eigenen Versuche ist.

In den Untersuchungen von SMITH und HERRICK (1944) war der Sauerstoffverbrauch sporulierender E. tenella-Oocysten in den ersten zehn Stunden konstant. In der elften und zwölften Stunde stieg er auf das Doppelte bzw. Dreifache des Durchschnittsverbrauches der ersten zehn Stunden an. Von diesem Zeitpunkt an nahm er ständig ab, um in der 48. Stunde ein Minimum zu erreichen. WILSON und FAIRBAIRN (1961) fanden bei sporulierenden E. acervulina-Oocysten einen gleichmäßig von der ersten Stunde an abnehmenden Sauerstoffverbrauch.

WAGENBACH und BURNS (1969) führten jeweils zwei Versuche mit sporulierenden Oocysten von E. tenella und E. stiedai durch. Der Sauerstoffverbrauch beider Oocystenarten zeigte einen unregelmäßigen Verlauf. Bei E. tenella-Oocysten betrug der Sauerstoffverbrauch in den ersten zwölf Stunden weniger als ein Drittel des Wertes, den SMITH und HERRICK (1944) gefunden haben. Im Verlauf der Sporulation beider Arten gab es kurze Perioden mit verminderter Sauerstoffaufnahme. Bei E. stiedai zeigten sich solche Verminderungen des Sauerstoffverbrauches in dem einen Versuch zweimal und im anderen Versuch einmal. Im weiteren Verlauf der Versuche trat bei beiden Oocystenarten eine langsame Abnahme des Sauerstoffverbrauches auf.

WAGENBACH und BURNS (1969) erklärten diesen Unterschied im Verlauf der Sauerstoffaufnahme zwischen ihren Ergebnissen und denen von SMITH und HERRICK (1944) und WILSON und FAIRBAIRN (1961) mit der höheren Empfindlichkeit ihre polarographischen Methode. Für den niedrigeren Sauerstoffverbrauch der E. tenella-Oocysten als in den Versuchen von SMITH und HERRICK (1944) können WAGENBACH und BURNS (1969) keine Erklärung abgeben.

Bei den eigenen Untersuchungen verbrauchten die sporulierenden Oocy-

sten von E. stiedai bis zur 24. bis 36. Stunde etwa die gleiche Menge Sauerstoff pro Zeiteinheit. Der von SMITH und HERRICK (1944) bei E. tenella-Oocysten in der elften und zwölften Stunde beobachtete steile Anstieg des Sauerstoffverbrauches konnte weder in sonstigen Literaturangaben (WILSON und FAIRBAIRN (1961); WAGENBACH und BURNS (1969)) gefunden noch in den eigenen Versuchen bestätigt werden. Vom zweiten Tag der Sporulation an nahm der Sauerstoffverbrauch ständig ab. Ein verminderter Sauerstoffverbrauch, der sich in den aufgezeichneten Summationskurven als ein "Plateau" ausdrücken müßte, war nur in einzelnen Fällen zu beobachten. Die Zeit des Auftretens dieser "Plateaus" war nicht konstant, sie erschienen unregelmäßig zwischen der 24. und 48. Stunde und waren nicht so typisch für den Sauerstoffverbrauch im Verlaufe der Sporulation, wie es WAGENBACH und BURNS (1969) annehmen. Dieses Fehlen der "Plateaus" kann allerdings dadurch zustande gekommen sein, daß bei den eigenen Untersuchungen niemals eine Synchronisation der Sporulation beobachtet wurde und daß die Ablesungsintervalle zu groß waren, um eine kurzdauernde Depression wahrzunehmen. WAGENBACH und BURNS (1969) konnten ihren Befund nicht erklären. Möglicherweise besteht bei diesem verminderten Sauerstoffverbrauch ein Zusammenhang mit der von CHEISSIN (1935) mitgeteilten Tatsache, daß sich in gewissen Stadien der Sporulation die Coccidien-oocysten unter anaeroben Verhältnissen weiterentwickeln können.

Hinsichtlich des Sauerstoffverbrauches bestehen zwischen den mit Hilfe verschiedener Isolierungsmethoden gewonnenen Oocystensuspensionen innerhalb einer Versuchsreihe und Zeitgruppe mit drei Ausnahmen (I_{4-6} LA : LV : I_{4-6} GB : DA : II_{4-6} LA : LV) in allen Fällen signifikante Unterschiede. Da jedoch die Reihenfolge in der Größenordnung des Sauerstoffverbrauches zwischen Oocysten aus der Leberausspülung und der Leberverreibung (LA und LV) einerseits sowie Gallenblasenausspülung und Darmauswaschung (GB und DA) andererseits in den einzelnen Versuchen wechselt, ist eine Aussage über Differenzen zwischen dem Sauerstoffverbrauch der einzelnen Gruppen innerhalb dieser beiden Gruppierungen nicht sinnvoll. Faßt man jedoch die mit Oocysten aus der Leberausspülung und Leberverreibung (LA und LV) bzw. Gallenblasenausspülung und Darmauswaschung (GB und DA) erzielten Ergebnisse zu zwei größeren Gruppen zusammen, so be-

stehen eindeutige Unterschiede sowohl zwischen diesen beiden Gruppen als auch zwischen jeweils einem Glied der einen Gruppierung und den beiden Gliedern der anderen Gruppenkombination.

Der Grund dafür scheint in dem unterschiedlichen Reifungsgrad der Oocysten zu liegen. Die Oocysten aus dem Darm und aus der Gallenblase sind am weitesten ausgereift und liegen zur Ausscheidung in diesen Organen bereit, während die Oocysten in den Gallengängen (LA) und im Lebergewebe (LV) einen unterschiedlichen meist jedoch geringeren Reifungsgrad aufweisen und erst nach einer ungewissen Zeit in die Gallenblase gelangen. Wie die Versuchsergebnisse und die statistischen Untersuchungen zeigen, scheint also eine Unterscheidung zwischen E. stiedai-Oocysten aus den Gallengängen (LA) und aus dem Lebergewebe (LV) bzw. zwischen denen aus der Gallenblase (GB) und aus dem Darm (DA) nicht nötig zu sein. Es wäre daraus zu schließen, daß E. stiedai-Oocysten aus der Leber vor ihrer Sporulation noch eine sauerstoffabhängige Reifung durchmachen müssen.

Der Befund von WILSON und FAIRBAIRN (1961), daß sich der Sauerstoffverbrauch von E. acervulina-Oocysten nach einer längeren Aufbewahrungszeit vermindert, wurde in den eigenen Versuchen an E. stiedai-Oocysten statistisch nicht in jedem Fall gesichert. Jedoch scheint ein solcher Trend zu bestehen, der aber durch weitere Versuche bestätigt werden müßte.

Im Gegensatz zu den Befunden von WILSON und FAIRBAIRN (1961) an E. acervulina-Oocysten, ist die Zahl der sporulierenden Oocysten von E. stiedai nach einer Aufbewahrungszeit von 30 Tagen in den eigenen Untersuchungen nicht vermindert.

Zwischen dem Sauerstoffverbrauch der Oocysten gleicher Herkunft (Isolierungsmethode beider Versuche, Vers. I₁₋₆ : II₁₋₆) bestehen in jedem Fall, selbst wenn die teilweise gesicherten Unterschiede der Zeit unberücksichtigt bleiben, signifikante Unterschiede. An Hand der erhaltenen t-Werte läßt sich sagen, daß diese Differenzen noch grösser und besser gesichert sind als die oben erwähnten Unterschiede zwischen den Ergebnissen mit Oocysten aus verschiedenen Isolierungsmethoden einer Versuchsreihe.

Für die Praxis bedeutet dies, daß zumindest bei allen Stoffwechseluntersuchungen nach Möglichkeit stets Oocysten aus demselben infizierten Tier oder aus derselben infizierten Tiergruppe und derselben Herkunft (Isolierungsmethode) zu verwenden sind; die Dauer der Aufbewahrung spielt dagegen keine so große Rolle. Nur bei Kenntnis dieser Faktoren bzw. der in größeren Versuchen zu bestimmenden, durch diese Faktoren verursachten Streubreite sind Angaben von Versuchsergebnissen, die an verschiedenen Stellen oder mit Oocysten aus verschiedenen infizierten Tieren oder Tiergruppen durchgeführt wurden, miteinander vergleichbar. Diese Tatsache könnte auch für die erheblichen Unterschiede zwischen den Sauerstoffverbrauchswerten der E. tenella-Oocysten bei den Untersuchungen von SMITH und HERRICK (1944) und WAGENBACH und BURNS (1969) eine große Rolle gespielt haben.

Über den Sauerstoffverbrauch versporter Oocysten von E. stiedai liegen zur Zeit keine Angaben vor. Zum Vergleich der eigenen Ergebnisse muß auf die Arbeit von SMITH und HERRICK (1944) zurückgegriffen werden. Bei ihren Versuchen stellten die Autoren fest, daß 100.000 versporte Oocysten von E. tenella nur 0,04 μ l Sauerstoff pro Stunde verbrauchten. Dabei wurde allerdings nichts über das Alter der Oocysten nach der Sporulation gesagt. In den eigenen Untersuchungen wurde der Sauerstoffverbrauch versporter E. stiedai-Oocysten in Abhängigkeit von der Aufbewahrungszeit nach der Sporulation gemessen. Bis zu einem bestimmten Alter nach der Sporulation (mindestens 8 Tage lang) verbrauchten 100.000 Oocysten von E. stiedai mit etwa 0,1 μ l Sauerstoff/Stunde fast ebensoviel Sauerstoff wie am Ende der Sporulation. Erst nach dieser Zeit stellt sich eine geringe Sauerstoffaufnahme ein, die mit ca. 0,05 μ l/100.000 Oocysten/Stunde etwa dem von SMITH und HERRICK (1944) bei E. tenella gemessenen Wert entspricht.

Das zeigt, daß die Oocysten von E. stiedai nach Beendigung der Sporulation möglicherweise noch einen Reifungsprozess durchmachen, der von erhöhter Sauerstoffaufnahme begleitet wird. Inwieweit dieser Reifungsprozess einen Einfluß auf die Infektionsfähigkeit versporter Oocysten hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

VI. Zusammenfassung

Der Sauerstoffverbrauch von Eimeria stiedai-Oocysten wurde während und nach der Sporulation mit der direkten Warburgmethode gemessen. In Vorversuchen wurde der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Kalilauge und von verschiedenen Aufbewahrungsmedien auf die Oocysten geprüft.

Die Sauerstoffverbrauchsmessungen an sporulierenden E. stiedai-Oocysten erfolgten in zwei Versuchsreihen unter Verwendung von Material, das einerseits mit Hilfe von vier verschiedenen Isolierungsmethoden direkt aus dem Lebergewebe, aus den Gallengängen, aus der Gallenblase und aus dem Darm gewonnen und andererseits für die Dauer von 1 - 30 Tagen bei ca. $+3^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt worden war. Jede Versuchsreihe bestand aus sechs aufeinanderfolgenden Versuchen, in denen der Sauerstoffverbrauch der Oocysten der vier verschiedenen Isolierungsmethoden in je drei Paralleluntersuchungen bestimmt wurde. Die Sauerstoffverbrauchsmessungen der versporteten E. stiedai-Oocysten erfolgten in vier Versuchen unter Berücksichtigung der Aufbewahrungszeit nach der Sporulation.

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1. Eine 15 Minuten dauernde Einwirkung 20 %iger Kalilauge war ausreichend, um die E. stiedai-Oocysten frei von Leberdetritus zu gewinnen. Eine zweistündige Einwirkung 20 %iger Kalilauge hatte keinen Einfluß auf die Oocysten.
2. Sowohl 2 %ige Kaliumbichromatlösung als auch Hostamycin® in einer Konzentration von 20 mg/ml sind als Suspensionsmedien für die keimfreie Aufbewahrung und Sporulation der Oocysten von E. stiedai geeignet.
3. Die ersten morphologisch sichtbaren Sporulationsstadien der E. stiedai-Oocysten traten bei einer Temperatur von $+28^{\circ}\text{C}$ und dauernder Bewegung im Warburgapparat nach ca. 12 Stunden auf. Die Sporulation war morphologisch innerhalb 48 Stunden weitgehend beendet. Eine Synchronisation der verschiedenen Sporulationsstadien wurde nicht beobachtet.

4. Die Oocysten von E. stiedai verbrauchten in den ersten 24 bis 36 Stunden ihrer Sporulation mehr Sauerstoff als in der darauffolgenden Zeit. Zwischen der 24. und 48. Stunde waren in einigen Fällen Andeutungen einer kurzfristigen Verminderung des Sauerstoffverbrauches zu beobachten.
5. Nach der Höhe ihres Sauerstoffverbrauches können die aus einer Leberverreibung (LV) und Leberausspülung (LA) bzw. Gallenblasenausspülung (GB) und Darmauswaschung (DA) isolierten Oocysten zu einer Gruppe zusammengefaßt werden. Die Unterschiede im Sauerstoffverbrauch beider Gruppen (LV + LA : GB + DA) sind signifikant. Ebenso wurden signifikante Unterschiede zwischen dem Sauerstoffverbrauch von Oocysten der gleichen Isolierungsmethode, die jedoch aus verschiedenen infizierten Tiergruppen stammten, gefunden. Der Befund, daß sich nach längerer Aufbewahrung nicht versporter Oocysten bei ca. +3°C ihr Sauerstoffverbrauch während der anschließenden Sporulation vermindert, konnte nicht in allen Fällen statistisch gesichert werden.
6. Bis zum achten Tag nach der Sporulation verbrauchten die Oocysten von E. stiedai ebensoviel Sauerstoff wie unmittelbar im Anschluß an diese. Erst danach kommen sie in eine relative Stoffwechselruhe, in der ihr Sauerstoffverbrauch nur noch äußerst gering ist.

S u m m a r y

The oxygen consumption of E. stiedai oocysts during and after Sporogony was determined by the direct Warburg methode. The effects of Potassium hydroxyde solutions in varying concentrations and of different media for storage and cultivation, upon the oocysts were tested in preliminary experiments.

The oxygen consumption of sporulating E. stiedai oocysts, with particular reference to the source of the oocysts (biliary ducts (LA), livertissue (LV), gall bladder (GB) and duodenum (DA)) on the one hand, and of the length of storage (1-30 days) at a temperatur of $+3^{\circ}\text{C}$ on the other hand, was measured in two series of experiments. Each series consisted of six experiments in which the respiratory rate of the oocysts from the four different sources were determined in triplicate runs.

In four experiments, the oxygen-intake of sporulated E. stiedai oocysts was measured, giving particular consideration to the age of the oocysts after sporulation.

The following results were obtained:

1. E. stiedai oocysts could be obtained free of liver detritus after 15 minutes incubation in 20 % Potassium hydroxyde solution. Oocysts kept for two hours in 20 % Potassium hydroxyde were not damaged.
2. Solutions of 2 % Potassium dichromate or Hostamycin[®] (20 mg/ml) proved to be good media for the sterile storage and sporulation of E. stiedai oocysts.
3. The first morphologically distinguishable stages of sporulation of the E. stiedai oocysts were seen after about 12 hours at $+28^{\circ}\text{C}$ and constant shaking in the Warburg apparatus. Sporulation was more or less completed in 48 hours. The sporulating oocysts went through each stage in a nonsynchronized fashion.
4. E. stiedai oocysts required more oxygen in the first 24 to 36 hours of sporogony than in the time thereafter. In some cases there were indications of a respiratory depression between the

24th and 48th hour of sporulation.

5. Considering the respiratory rate during sporogony, E. stiedai oocysts could be divided into two groups viz.:

- a). Oocysts from the liver, biliary ducts (LA) and liver tissue (LV), and
- b). those from the gall bladder (GB) and the duodenum (DA).

The differences between the oxygen consumption of the two groups were statistically proved. There were also significant differences between the oxygen-intake of E. stiedai oocysts from similar sources but from different groups of infected rabbits. The findings, that oocysts require less oxygen for their sporulation after a long storage period did not in all cases stand statistical tests.

6. Up till the eighth day after sporogony, E. stiedai oocysts had a respiratory rate equal to that at the end of sporogony. After this time, the respiratory rate was very minute.

V e r z e i c h n i s d e r T a b e l l e n

<u>Tabelle</u>		<u>Seite</u>
1	Einfluß der Temperatur auf die Sporulationsfähigkeit und die Sporulation von Coccidienocysten	3-5
2	Reinigungsgrad und Sporulationsrate der mit Kalilauge unterschiedlicher Konzentrationen behandelten <u>E. stiedai</u> -Oocystensuspensionen	17
3	Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung und Sporulationskontrolle der Oocysten von <u>E. stiedai</u> in verschiedenen Aufbewahrungsmedien	19
4	Ergebnisse der Verlaufskontrolle der Sporulation einen Tag alter Oocysten von <u>E.stiedai</u> verschiedener Herkünfte	23
5	Ergebnisse der Verlaufskontrolle der Sporulation sechs Tage alter <u>E. stiedai</u> -Oocysten verschiedener Herkünfte	24
6	Sauerstoffverbrauch und Sporulationsdaten sporulierender <u>E. stiedai</u> -Oocysten aus der Leberausspülung und Leberverreibung in der ersten Hauptversuchsreihe nach 0-5 Wochen Aufbewahrung und einer Sporulationszeit von 72 Stunden	28
7	Sauerstoffverbrauch und Sporulationsdaten sporulierender <u>E. stiedai</u> -Oocysten aus der Gallenblasenausspülung und Darmauswaschung in der ersten Hauptversuchsreihe nach 0-5 Wochen Aufbewahrung und einer Sporulationszeit von 72 Stunden	29
8	Sauerstoffverbrauch und Sporulationsdaten sporulierender <u>E. stiedai</u> -Oocysten aus der Leberausspülung und Leberverreibung in der zweiten Hauptversuchsreihe nach 0-5 Wochen Aufbewahrungszeit und einer Sporulationszeit von 72 Stunden	30
9	Sauerstoffverbrauch und Sporulationsdaten sporulierender <u>E. stiedai</u> -Oocysten aus der Gallenblasenausspülung und Darmauswaschung in der zweiten Hauptversuchsreihe nach 0-5 Wochen Aufbewahrung und einer Sporulationszeit von 72 Stunden	31

<u>Tabelle</u>		<u>Seite</u>
10	Einzel- und Durchschnittswerte des Sauerstoffverbrauches der <u>E. stiedai</u> -Oocysten nach einer Sporulationszeit von 72 h, bezogen auf 100.000 sporulationsfähige Oocysten.	37
11	Vergleich des Sauerstoffverbrauches sporulierender <u>E. stiedai</u> -Oocysten verschiedener Herkünfte (Leberverreibung, Leberausspülung, Gallenblasenausspülung und Darmauswaschung) und nach unterschiedlicher Aufbewahrungsdauer (1-12 und 18-30 Tage) mittels Varianzanalyse	38
12	Vergleich des Sauerstoffverbrauches sporulierender <u>E. stiedai</u> -Oocysten der beiden Herkunftsgruppen (Leberausspülung und Leberverreibung : Gallenblasenausspülung und Darmauswaschung) und nach unterschiedlicher Aufbewahrungsdauer (1-12 und 18-30 Tage) mittels Varianzanalyse	39
13	Ergebnisse des t-Testes zum Vergleich des Sauerstoffverbrauches sporulierender <u>E. stiedai</u> -Oocysten der verschiedenen Herkünfte (Leberausspülung, Leberverreibung, Gallenblasenausspülung und Darmauswaschung) innerhalb der Zeitgruppen (1-12 und 18-30 Tage Aufbewahrungsdauer)	40-41
14	Ergebnisse des t-Testes zum Vergleich des Sauerstoffverbrauches sporulierender <u>E. stiedai</u> -Oocysten der Herkunftsgruppen (Leberausspülung und Leberverreibung und Gallenblasenausspülung und Darmauswaschung) und der Zeitgruppen (1-12 und 18-30 Tage Aufbewahrungsdauer)	41
15	Vergleich des Sauerstoffverbrauches der Oocysten gleicher Herkunft mit verschiedenen Aufbewahrungszeiten (1-12 und 18-30 Tage Aufbewahrungsdauer) mittels Varianzanalyse	42
16	Ergebnisse des t-Testes zum Vergleich des Sauerstoffverbrauches sporulierender <u>E. stiedai</u> -Oocysten der beiden Hauptversuchsreihen (I und II) unter Berücksichtigung der gleichen Herkunft (Isolierungsmethode)	43

<u>Tabelle</u>	<u>Seite</u>
17 Sporulationsgrad, Sporulationsindex und Sauerstoffverbrauch von <u>E. stiedai</u> -Oocysten 72 und 96 Stunden nach Sporulationsbeginn (Erste Versuchsreihe)	46
18 Sporulationsgrad, Sporulationsindex und Sauerstoffverbrauch von <u>E. stiedai</u> -Oocysten 72 und 96 Stunden nach Sporulationsbeginn (Zweite Versuchsreihe)	47

V e r z e i c h n i s d e r A b b i l d u n g e n

<u>Abb.-Nr.</u>		
1 + 2	Sauerstoffverbrauch sporulierender <u>E. stiedai</u> -Oocysten aus vier verschiedenen Isolierungsmethoden (Leberausspülung, Leberverreibung, Gallenblasenausspülung und Darmauswaschung) Abb. 1, Vers. I ₂ , Abb. 2, Vers. I ₃	32
3 + 4	Verhältnis des Sporulationsindexes zum Sauerstoffverbrauch sporulierender <u>E. stiedai</u> -Oocysten aus vier verschiedenen Isolationsmethoden (Leberausspülung, Leberverreibung, Darmauswaschung und Gallenblasenausspülung) Abb. 3, Vers. I ₄ , Abb. 4, Vers. I ₅	33
5	Sauerstoffverbrauch sporulierter <u>E. stiedai</u> -Oocysten nach unterschiedlicher Aufbewahrungsdauer nach der Sporulation	45

VII. Literaturverzeichnis

- AVERY, J.L.: The effects of moderately low temperature on the sporulation of oocysts of two species of swine coccidia
J. Parasit., 28 : Suppl. (1942)
- BECKER, E. R. and
CROUCH, H. B.: Some effects of temperature upon the development of oocysts of coccidia
Proc. Soc. exp. Biol., 28 : 529 (1931)
- BORCHERT, A. : Lehrbuch der Parasitologie für Tierärzte
Hirzel Verlag, Leipzig (1962)
- CANNING, E. W. and
ANWAR, M. : Studies on the meiotic division in coccidial and malarial parasites
J. Protozool., 15 : 290 - 298 (1968)
- CHANG, K. : Effects of temperature on the oocysts of Eimeria (Coccidia, Protozoa)
Proc. Iowa. Acad. Sci., 44 : 204 - 205 (1937)
- CHEISSIN, E. : Vom Einfluß anärober Bedingungen auf verschiedene Sporulationsstadien der Oocysten von E. magna und E. stiedai
Archiv f. Protistenk., 85 : 426 - 435 (1935)
- CHEISSIN, E. : Duration of lifecycle in rabbit coccidia
C. R. Acad. Sci. USSR., 52 : 557 - 560 (1946)
- CHRISTENSEN, J. : Sporulation and viability of oocysts of E. arloingi from domestic sheep
J. Agric. Res., 59 : 527 - 534 (1939)
- DAVIES, S. M. ;
JOYNER, L. P. and
KENDALL, S. B. : Coccidiosis
Oliver & Boyd Ltd., Edingburgh (1963)
- DOGIEL, V. A.,
POLJANSKI, G. O. and
CHEISSIN, E. M. : Parasitologische Schriftreihe, Heft 16
Gustav Fischer Verlag, Jena (1963)
- DUNCAN, S. : The effects of some chemical and physical agents on the oocysts of the pigeon coccidium, E. labbeana (Pinto, 1928)
J. Parasit., 45 : 191 - 192 (1959)

- DÜRR, U. und PELLERDY, L. : Zum Sauerstoffverbrauch der Kokzidien während der Sporulation
Acta Vet. Acad. Sci. hung., 19 : 307 - 310 (1969)
- EDGAR, S. A. : Sporulation of the oocysts at specific temperatures and notes on the prepatent period of several species of avian coccidia
J. Parasit., 41 : 214 - 216 (1938)
- ELLIS, C. C. : Studies on the viability of the oocysts of E. tenella, with particular reference to the conditions of incubation.
Cornell Vet., 28 : 267 - 274 (1938)
- FISH, F. : The effects of physical and chemical agents on the oocysts of E. tenella
Science, 73 : 292 - 293 (1931)
- GOODRICH, H. : Coccidial Oocysts
Parasitology, 36 : 72 - 79 (1944)
- HENRY, D. P. : A study of the species of Eimeria occurring in the swine
Zoology, 36 : 115 - 126 (1931)
- HERRICK, C. : Resistance of the oocysts of E. tenella to incubator conditions
Poult. Sci., 14 : 246 - 252 (1935)
- KLEINZELLER, A. : Manometrische Methoden und ihre Anwendung in der Biologie und Biochemie
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1965)
- KOELLE, O. : Manometrie
B. Braun, Apparatebau, Melsungen (o. J.)
- KOTLAN, A. und PELLERDY, L. : A hazinyul coccidiosisának ismeretehez. Egyul Eimeria-faj (E. piriformis sp.n.) hazinyulbol.
Allatorvos! Lapok, 1934, 15
- LANDERS, E. : The effect of low temperature upon the viability of unsporulated oocysts of ovine coccidia
J. Parasit., 39 : 547 - 552 (1953)

- LAPAGE, G. : The study of coccidiosis (E. caviae (SHEATHER, 1942)) in the guinea pig. Vet. J., 96 : 144 - 154 (1940)
- LEVINE, L. D. : Protozoan parasites of domestic animals and of man
Burgess Publ. Coy. Mineapolis (1961)
- MARQUARDT, W. : The effects of temperature on the sporulation of E. zuerni of cattle
J. Protozool., 4, Suppl. : 10 (1956/57)
- MARQUARDT, W.,
SENGER, C. M. and
SEGHETTI, L. : The effects of physical and chemical agents on the oocysts of E. zuerni (Protozoa, Coccidia)
J. Protozool., 7 : 186 - 189 (1960)
- MARQUARDT, W. and
KALLOOR, M. M. : The effect of temperature and oxygen on the development of the oocysts of E. nieschulzi
J. Protozool., 9 Suppl.: 9 (1962)
- METZNER, R. : Untersuchungen an Coccidium cuniculi
Archiv f. Protistenk., 2 : 13 - 72 (1903)
- PATTERSON, F. D. : Studies on the viability of E. tenella in soil
Cornell Vet., 23 : 232 - 249 (1933)
- PELLERDY, L. : Coccidia and Coccidiosis
Akademia Kiado, Budapest (1965)
- PFEIFFER, R. : Beiträge zur Protozoenforschung, Heft 1:
Die Coccidienkrankheit der Kaninchen
August Hirschwald Verlag, Berlin (1892)
- RIBI, E. : Purification of Q-Fever Rickettsiae by Density-Gradient Sedimentation
J. Immunol., 85 : 314 - 318 (1960)
- SHARMA, N. N.,
FORSTER, J. L. and
REID, W. M. : Cleaning of coccidial oocysts by Density-Gradient Sedimentation
J. Parasit., 48, Suppl. : 48
- SHARMA, N. N. : A cleaning method for coccidial oocysts using Density-Gradient Sedimentation
J. Parasit., 49 : 159 - 160 (1963)

- SMITH, B. F., HERRICK, C. A. : The respiration of the protozoan parasite, E. tenella
J. Parasit., 30 : 295 - 302 (1944)
- STEINHAGEN, F. : Ein Beitrag zur Reinigung von Coccidienocysten
DTW., 81 : 471 - 473 (1968)
- UMBREIT, W. W.,
BURRIS, R. H. and
STAUFFER, J. F. : Manometric Techniques
Burgess Publ. Coy., Mineapolis (1964)
- VETTERLING, J. M. : Oxygen consumption of coccidial sporozoites during in vitro excystation
J. Protozool., 15 : 520 - 522 (1968)
- WAGENBACH, G. E.,
CHALLEY, J. R. and
BURNS, W. C. : A method for purifying coccidial oocysts employing Clorox and Sulfuric acid - dichromate solution
J. Parasit., 52 : 1222 (1966)
- WAGENBACH, G. E. and
BURNS, W. C. : Structure and respiration of sporulating E. stiedai and E. tenella oocysts
J. Protozool., 16 : 257 - 263 (1969)
- WASIELEWSKI, Th. von : Studien und Mikrophotogramme zur Kenntnis der pathogenen Protozoen. I. S. 61 - 64, A. Barth Verlag, Leipzig, (1904)
- WILSON, P. A. D. and
FAIRBAIRN, D. : Biochemistry of sporulation in oocysts of E. acervulina
J. Protozool., 8 : 410 - 416 (1961)

Herrn Professor Dr. G. Lämmle möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und das ständige Interesse an meiner Arbeit herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. U. Dürr für seine wertvollen Anregungen und Ratschläge, die er mir jederzeit gewährt hat.

Weiterhin bin ich Herrn Priv. Doz. Dr. Regges für die Beratung und Unterstützung bei der statistischen Auswertung zu Dank verpflichtet.

L e b e n s l a u f

Am 9. 7. 1942 wurde ich als Sohn des Schulrates Ogunlade Aina Ayeni und seiner Ehefrau, Asabi Adebamiwa, in Ikole-Ekiti, Nigeria, geboren.

Von 1948 - 1954 besuchte ich die anglikanischen Volksschulen in Inisa und Ijero-Ekiti und die vereinigte (anglik. methodistisch) Volksschule in Oye-Ekiti, an der ich Ende 1954 die Abschlußprüfung ablegte.

1955 - 1959 besuchte ich die Christ school in Ado-Ekiti, an der ich 1959 die "West-African School Certificate Examinations" der Universität von Cambridge ablegte.

1960/61 studierte ich Physik, Chemie, Zoologie und Botanik an der gleichen Schule und legte im Dezember 1961 die "Higher School Certificate Examinations" der Universität von Cambridge ab.

Von Januar 1962 bis April 1963 war ich Lehrer für Mathematik und Naturwissenschaften (Physik, Biologie und Chemie) in drei Gymnasien in Nigeria.

Im Mai 1963 reiste ich nach Deutschland, um Veterinärmedizin zu studieren. Nach einem Sprachkursus von sechs Monaten an dem Goethe-Institut in Degerndorf/Inn und Bad Reichenhall, fing ich mit dem Studium der Veterinärmedizin an der Justus Liebig-Universität in Giessen im Wintersemester 1963/64 an, das ich im Oktober 1968 erfolgreich beendete.

Seit Oktober 1968 arbeite ich an meiner Dissertation im Institut für Parasitologie und Parasitäre Krankheiten der Haustiere in Giessen.

SECRET

On 12/12/54, the subject was interviewed by the Special Agent in Charge, New York, and the following information was obtained:

The subject is a male, born [redacted], [redacted], New York. He is a [redacted] and has been employed by the [redacted] since [redacted]. He is a [redacted] and has been employed by the [redacted] since [redacted].

The subject is a [redacted] and has been employed by the [redacted] since [redacted]. He is a [redacted] and has been employed by the [redacted] since [redacted].

The subject is a [redacted] and has been employed by the [redacted] since [redacted]. He is a [redacted] and has been employed by the [redacted] since [redacted].

The subject is a [redacted] and has been employed by the [redacted] since [redacted]. He is a [redacted] and has been employed by the [redacted] since [redacted].

The subject is a [redacted] and has been employed by the [redacted] since [redacted]. He is a [redacted] and has been employed by the [redacted] since [redacted].

